

**Funktionelle Charakterisierung des Oviductins der Hauskatze (*Felis catus*):
Expression und Interaktion bei reproduktionsbiologischen Vorgängen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum agriculturalarum
(Dr. rer. agr.)

eingereicht an der
Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dipl. Agr.-Biol. Alexandra Hachen, geb. Kaffenberger

Präsident
der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan
der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachterin/Gutachter

1. Prof. Dr. Katarina Jewgenow
2. Dr. Joachim Weitzel
3. Prof. Dr. Christine Wrenzycki

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2015

Dieser Doktorarbeit liegen folgende Veröffentlichungen zugrunde:

- Artikel 1: Hachen A¹, Jewgenow K¹, Braun BC¹. (2012) **Sequence analysis of feline Oviductin and its expression during the estrous cycle in the domestic cat (*Felis catus*)**. Theriogenology. 77(3):539-49.
([http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(11\)00448-1/fulltext](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(11)00448-1/fulltext))
- Artikel 2: Hachen A¹, Jewgenow K¹, Krause E², Braun BC¹. (2012) **Recombinant feline Oviductin - a powerful tool for functional IVF studies in the domestic cat**. Reprod Domest Anim. 47 (Suppl. 6):88-92.
(<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.12030/full>)
- Artikel 3: Hribal R^{1*}, Hachen A^{1*}, Jewgenow K¹, Zahmel J¹, Fernandez-Gonzalez L¹, Braun BC¹. (2014) **The influence of recombinant feline Oviductin on different aspects of domestic cat (*Felis catus*) IVF and embryo quality**. Theriogenology 82(5):742-49.
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X14002878>)

¹ *Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung, Abteilung für Reproduktionsbiologie, Alfred-Kowalke-Str. 17, 10315 Berlin*

² *Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin*

** Die Beiträge beider Autoren sind gleichberechtigt.*

Inhalt

Zusammenfassung	1
Summary	3
Einleitung.....	5
Anatomie und Physiologie des Eileiters	5
Der Zyklus der Hauskatze	5
Struktur von Oviductin	6
Expression von Oviductin	7
Interaktion mit Eizellen	7
Interaktion mit Spermien	9
Einfluss von Oviductin auf Befruchtung und Embryonalentwicklung.....	9
Zielstellung	10
Zusammenfassung der Artikel.....	11
Artikel 1	11
Artikel 2	12
Artikel 3	14
Diskussion	16
Felines Oviductin	17
Expression des felines Oviductins	19
Rekombinante Expression von felinem Oviductin	21
Funktionelle Versuche mit felinem Oviductin	23
Schlussfolgerung und Ausblick	26
Quellenangaben	28
Anhang	37
Artikel 1	37
Artikel 2	49
Artikel 3	55

Zusammenfassung

In der Forschung dient die Hauskatze (*Felis catus*) als Modellspezies für die Entwicklung und Verbesserung assistierter Reproduktionstechniken (Assisted reproductive techniques, ART) für wildlebende Katzenarten, von denen die meisten der 36 wildlebenden Arten auf der Roten Liste für bedrohte Tierarten als gefährdet eingestuft sind (International Union for Conservation of Nature Red List of threatened species, <http://www.IUCN.org>). Eine erfolgreich angewandte Methode der ART bei Hauskatzen ist die In-vitro-Produktion von Embryonen (IVP). Allerdings gestaltet sich die Übertragbarkeit der Protokolle auf andere Feliden aufgrund speziesspezifischer reproduktionsbiologischer Besonderheiten oft sehr schwierig. Der Zugang zu Eizellen und Spermien bzw. Eierstöcken und Hoden ist limitiert, zudem ist die Qualität des biologischen Materials aufgrund des Alters, Gesundheitszustandes sowie der teilweise langen Transportwege oft schlecht. Um trotzdem erfolgreich Embryonen in-vitro produzieren zu können, ist es nötig, die In-vitro-Bedingungen so weit wie möglich an die In-vivo-Situation im Eileiter, in dem die Reifung der Gameten, Befruchtung und frühe Embryonalentwicklung stattfinden, anzupassen.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war daher die Charakterisierung des felines Oviductins, ein Glykoprotein, welches ausschließlich im Eileiter exprimiert wird und das in mehreren Studien bei anderen Tierarten einen positiven Effekt auf die Interaktion der Gameten, Befruchtung, Teilungsraten und Embryonalentwicklung gezeigt hat.

Das Ziel in **Artikel 1** war die Identifizierung der Gen-Sequenz des felines Oviductins und die Beantwortung der Frage, wie Oviductin bei der Hauskatze im Verlauf des Zyklus sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene exprimiert wird. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wurde der vollständige kodierende Bereich des Oviductingens der Hauskatze (basierend auf mRNA/cDNA) identifiziert. Diese Sequenz kodiert ein Kernprotein aus 558 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 62 kDa (ohne posttranslationale Modifizierungen). Die Untersuchung der Expression von Oviductin-mRNA während des Zyklus wurde mit Real-time quantitativer PCR (qPCR) durchgeführt. Die Proteinexpression während des Zyklus wurde immunhistochemisch auf Eileitergewebeschnitten untersucht. Beide Ansätze zeigten eine zyklus- und somit vermutlich auch östrogenabhängige Expression von Oviductin. Die meisten mRNA-Kopien wurden während des Proöstrus und Östrus detektiert, wohingegen im Anöstrus und nach der Ovulation die mRNA-Expression stark absank. Auf den Gewebeschnitten fanden sich während des Proöstrus und Östrus im Eileiterepithel typische gefärbte Vesikel mit Oviductin. In den anderen Zyklusphasen war keine Immunreaktion zu sehen. Diese zyklusabhängige Expression wurde auch bei anderen Tierarten beobachtet und bestätigte die Vermutung, dass Oviductin auch bei der Hauskatze eine funktionelle Rolle spielen könnte.

Im nächsten Schritt ging es um die Frage, ob Oviductin aus dem Eileiter einen positiven Einfluss auf die IVP bei Hauskatzen hat. Doch obwohl wir regelmäßig vom Tierheim Berlin

Eierstöcke und Eileiter nach Routinekastrationen erhielten, unterlagen die Qualität und die Anzahl der Proben starken Schwankungen. Die benötigten Eileiter aus der Follikelphase waren nur während der reproduktiven Zeit im Frühling vorhanden, zudem war der Gehalt an nativem Oviductin, welches durch Eileiterspülungen gewonnen und in funktionellen Versuchen eingesetzt werden sollte, extrem gering.

Aus diesem Grund stellten wir in **Artikel 2** Oviductin rekombinant in *E.coli* her. Da in *E.coli* keine posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung möglich sind, aber natives Oviductin in verschiedenen Spezies als glykosyliert beschrieben wird, wurden zusätzlich eukaryotische Zellen (chinese hamster ovary cells, CHO-K1) mit der Oviductinsequenz transfiziert, um eine glykosylierte Version des Proteins zu synthetisieren. Das nicht-glykosylierte Protein wurde aus dem *E.coli*-Lysat mittels Anionenaustauschchromatographie und nachfolgender Metallaffinitätschromatographie (immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC) isoliert. Die Western Blot Analyse der aus der IMAC gewonnenen aufgereinigten Fraktionen zeigte ein deutliches Signal im Molekulargewichtsbereich von ca. 67 kDa. Für die Isolierung des glykosylierten rekombinanten Oviductins wurden stabil transfizierte CHO-K1 Zellen für zwei bis drei Tage in einem serum- und proteinfreien Medium kultiviert. Das Kulturmedium wurde anschließend gewonnen und aufkonzentriert. Für die Analyse des Erfolgs der rekombinanten Expression wurde das Konzentrat mittels Gelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) aufgetrennt.

Der Einfluss des nicht-glykosylierten rekombinanten feline Oviductins auf a) die Bindung von Spermien an die Zona Pellucida (ZP), b) die IVP sowie c) die Genexpression entwicklungsbiologisch interessanter Proteine in Blastozysten wurde in **Artikel 3** untersucht. Dabei zeigte sich, dass signifikant mehr Spermien an die ZP binden, wenn rekombinantes Oviductin anwesend war. Die Zugabe von Oviductin während der In-vitro-Fertilisation (IVF) hatte dagegen keinen Effekt auf Teilungsraten, Morula- oder Blastozystenraten. Im Gegensatz dazu zeigten Blastozysten, die sich nach der IVF mit Oviductin entwickelten, eine signifikant höhere mRNA-Expression von Gap junction alpha-1 protein (GJA1), einem Transmembranprotein, das als Marker für die Qualität in-vitro produzierter Embryonen dient.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Studien, dass das eileiterspezifische Glykoprotein Oviductin einen offensichtlichen Einfluss auf reproduktionsbiologische Vorgänge bei der Hauskatze hat. Mit rekombinant hergestelltem Protein können in Zukunft weitere Studien gemacht werden, um die biologische Funktion von Oviductin aufzuklären. Die Ergebnisse dieser Studien könnten dabei helfen, die In-vitro-Produktion von Embryonen bei bedrohten Katzenarten zu verbessern.

Summary

The domestic cat (*felis catus*) serves as a model to develop and improve assisted reproductive techniques (ART) for wild felid species from which most of them are listed on the IUCN Red List of threatened species (International Union for Conservation of Nature Red List of threatened species, <http://www.IUCN.org>). In-vitro embryo production (IVP) is successfully applied for the domestic cat but adaption to other felids because of the diversity in reproductive physiology is often difficult. The biggest challenge is to create an in-vitro environment as near as possible to in-vivo conditions within the oviduct where final maturation of gametes, fertilization and early embryo development occur.

Therefore, the aim of this doctoral thesis was to characterize feline oviductin, a glycoprotein which is exclusively expressed in the oviduct. Several functional studies with other species could show an influence of oviductin on gamete interaction, fertilization, cleavage rates and embryo development.

In **article 1**, we identified the gene sequence of the feline oviductin and examined oviductin expression during the oestrus cycle on both mRNA and protein level. Using methods of molecular biology, the full open reading frame for feline oviductin was sequenced, coding for a 558-amino acid protein with a mass of ~62 kDa (without posttranslational modifications). Investigation of oviductin mRNA expression during the oestrus cycle was done using real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Protein expression during the oestrus cycle was analyzed using immunohistochemistry. Both approaches revealed a cycle-dependent and therefore probably an estrogen-dependent expression of oviductin. Highest oviductin mRNA copy numbers were found in oestrus whereas in anoestrus and the luteal phase mRNA expression decreased. The same pattern was seen on protein level. On oviductal tissue sections immunostained secretory cells were only found during oestrus. After ovulation and during anoestrus no immunoreaction was detectable.

In a second step we wanted to use the native oviductin from feline oviducts to examine its influence on IVP. But although we received feline ovaries and oviducts regularly from the animal shelter Berlin, the sample size and quality were extremely fluctuating. Oviducts from oestrus stages were only available during the reproductive season in spring. In addition, the amount of native protein we could obtain from oviductal flushes and which should be used in functional studies, was very low. Therefore, in **article 2** recombinant feline oviductin was produced using recombinant protein expression in *E.coli*. *E.coli* is not able to synthesize posttranslational modifications. For this reason, we transfected eukaryotic chinese hamster ovary cells (CHO-K1) with an oviductin-gen-containing plasmid to get a glycosylated recombinant protein. Non-glycosylated oviductin was isolated from *E.coli* lysate using anion exchange chromatography followed by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). Western blot analysis of affinity purified fractions resulted in one clear protein band of ~67 kDa. For isolation of

glycosylated recombinant oviductin, stable transfected CHO-K1 cells were cultured in a serum- and protein-free medium for 2-3 days. Culture medium was harvested, concentrated and separated using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Influence of non-glycosylated recombinant feline oviductin on a) sperm-zona pellucida (ZP) binding, b) IVP and c) gene expression of several proteins in blastocysts was examined in **article 3**. Sperm-zona binding was significantly higher when recombinant oviductin was present. Addition of oviductin during in-vitro fertilization (IVF) had no effect on cleavage, morula rates or blastocyst development. In contrast, in blastocysts developed from IVF with oviductin, we found a significantly higher mRNA expression of gap junction alpha protein 1 (GJA1). GJA1, a transmembrane protein, serves as a marker for in-vitro produced embryos.

In conclusion, the presented studies show that oviduct-specific glycoprotein oviductin has an obvious effect on reproductive events in the domestic cat. Using recombinant protein, further studies can be performed to elucidate the biological role of oviductin. Results of these studies might help to improve in-vitro embryo production of wild felids.

Einleitung

Anatomie und Physiologie des Eileiters

Der Eileiter, auch *Tuba uterina*, Ovidukt oder Salpinx genannt, beginnt als paariges Organ unmittelbar am Eierstock (*Ovar*), mit dem er aber nicht fest verbunden ist. Der kraniale Teil des Eierstocks wird vom Eileiter mit seinem fransigen Trichter (*Infundibulum tubae uterinae*) umfasst, wobei einige Fransen des Infundibulums mit dem Ovar verwachsen sind. Nach dem Trichter folgt nach kaudal ein relativ weiter Teil des Eileiters, die *Ampulla tubae uterinae*. Im letzten Abschnitt verengt sich der Eileiter im *Isthmus tubae uterinae*, der sich in zahlreichen Windungen am Eierstock vorbeischlängelt und am uterotubalen Übergang in das Gebärmutterhorn mündet. Die Gesamtlänge des adulten Eileiters beträgt bei der Hauskatze 40-50 mm (König 1992).

Mikroskopisch kann man im Eileiter von innen nach außen drei Schichten differenzieren. Von der innen liegenden Schleimhaut (*Tunica mucosa*) aus werden Falten gebildet, die je nach Abschnitt des Eileiters unterschiedlich weit in das Lumen hineinreichen. Sie dienen der Oberflächenvergrößerung und sind im Bereich des Trichters und der Ampulle am größten und weisen zusätzlich eine starke Verzweigung auf. Im Bereich des Isthmus sind wenige und flache Falten zu finden. Das zum Lumen des Eileiters gerichtete Epithel ist ein einschichtig hochprismatisches Epithel, das zum größten Teil aus zilientragenden Zellen (Flimmerzellen) und sekretorischen Zellen (Drüsenzellen) besteht. Die Muskelschicht (*Tunica muscularis*) beinhaltet die Muskulatur aus glatten Muskelzellen, die dem Eileiter kontraktile Bewegungen ermöglicht. Die Stärke der Muskelschicht nimmt vom Isthmus Richtung Ampulle ab. Die *Tunica serosa* überzieht den Eileiter von außen mit einem einschichtigen Plattenepithel (Hees 1992).

Die Eierstocktasche (*Bursa ovarica*), die auch den Eileiter umgibt, sorgt dafür, dass die ovulierten Eizellen in den Trichter gelangen. Durch starken Zilienschlag der Epithelzellen und der Peristaltik der *Tunica muscularis* werden die Eizellen bis in die Gebärmutter (*Uterus*) transportiert. Die Wanderung der Eizellen durch den Eileiter dauert bei der Katze 4–7 Tage.

Der Zyklus der Hauskatze

Der Sexualzyklus der Katze ist polyöstrisch und unter natürlichen Lichtbedingungen saisonal (Wildt et al. 1981). Im Alter zwischen 6 und 9 Monaten kommt das Tier in die erste Rolligkeit. Die Ovulation wird bei der Katze durch den Deckakt induziert, meist durch Mehrfachbedeckungen. Allerdings sind auch spontane Ovulationen ohne Penetration möglich (Pelican et al. 2005). Falls es nicht zur Begattung kommt, läuft ein anovulatorischer Zyklus (Interöstrus) ab, der zwei bis vier Wochen andauert. Anschließend wird die Katze wieder rollig.

Erfolgt eine Kopulation, ohne dass es zur Befruchtung kommt, spricht man von Diöstrus oder Pseudogravidität. Die pseudogravide Lutealphase dauert 35-40 Tage, dann wird ein neuer Zyklus eingeleitet. Nach einer erfolgreichen Befruchtung dauert die Trächtigkeit 60-69 Tage. Im Spätsommer mit geringerer Tageslichtlänge bildet sich bei der Katze keine neue Follikelwelle mehr, es folgt die Phase des Anöstrus, die zwischen 50-150 Tage andauern kann (König 1992).

Struktur von Oviductin

Oviductin ist ein Glykoprotein, welches der Glykosylhydrolase Familie 18 zugeordnet werden kann, wobei bis jetzt in keiner untersuchten Tierart eine enzymatische Aktivität des Proteins nachgewiesen werden konnte. Oviductin mRNA wurde in Eileitern zahlreicher Spezies nachgewiesen, unter anderem bei Mensch (Arias et al. 1994), Pavian (Jaffe et al. 1996, Sendai et al. 1994), Rind (Sendai et al. 1994), Schwein (Buhi et al. 1996), Ziege (Pradeep et al. 2011), Schaf (DeSouza and Murray 1995), Hamster (Suzuki et al. 1995) und Maus (Sendai et al. 1995). Die entsprechenden Gensequenzen kodieren für ein Protein aus 527-721 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 58,5-76,5 kDa. Das Kernprotein zeigt eine hochkonservierte N-terminale Region mit Übereinstimmungen von 77%–84% zwischen den Arten. Große Unterschiede finden sich dagegen in der C-terminalen Region von Oviductin mit Übereinstimmungen von nur 37%–63%. In diesem Bereich befinden sich Glykosylierungsstellen für Kohlenhydratketten, die sowohl N-glykosidisch als auch O-glykosidisch gebunden sein können und deren Anzahl zwischen den Spezies stark variiert. Bei einigen Arten findet man im C-Terminus außerdem mehrere sich wiederholende Serin/Threonin-reiche Aminosäureeinheiten, sogenannte tandem-repeat Sequenzen. Diese tandem-repeats sind ein typisches Kennzeichen von Mucinen (Strous and Dekker 1992), die zahlreiche dieser Einheiten aufweisen. Mucine sind membrangebundene oder sekretierte Glykoproteine und bilden den strukturgebenden Teil des Schleims auf den Schleimhäuten. Serin/Threonin-Einheiten beinhalten potentielle Bindungsstellen für O-glykosidisch gebundene Kohlenhydratketten. Durch die massive Glykosylierung sind Mucine vor Proteolyse und dem Angriff von Säuren geschützt und erhalten je nach Glykosylierung adhäsive bzw. antiadhäsive Eigenschaften. Der Grad der Glykosylierung scheint auch bei Oviductin zu unterschiedlichen Isoformen des Proteins zu führen. Bei Schaf, Mensch, Pavian und Hamster existieren mindestens zwei Isoformen – eine basische und eine saure (Buhi 2002). Im Schwein wurden drei Isoformen (Kouba et al. 2000), im Rind sogar sieben Isoformen identifiziert (Vieira et al. 1999).

Expression von Oviductin

Die Expression und Synthese von Oviductin ist bei fast allen Spezies von der Östrogenkonzentration im Blutplasma abhängig und erreicht ihr Maximum bei Schwein, Schaf und Pavian zum Zeitpunkt des Östrus bzw. der späten Follikelphase beim Menschen (Buhi et al. 1996, DeSouza and Murray 1995, Verhage et al. 1997, Lok et al. 2002). Unter dem Einfluss von Östrogen bilden sich in den Drüsenzellen des Eileiterepithels sekretorische Vesikel aus, von welchen Oviductin in das Eileiterlumen abgegeben wird. In der Lutealphase ist Oviductin unter dem Einfluss von Progesteron bei diesen Spezies nur noch schwach oder gar nicht mehr nachweisbar (Buhi et al. 1996, Buhi et al. 1991, Verhage et al. 1988, Verhage and Fazleabas 1988). Im Gegensatz dazu findet man bei Arten mit einem relativ kurzen Zyklus diese östrogenabhängige Synthese von Oviductin nicht. Beim Kaninchen zeigt sich während des gesamten Zyklus eine gleichmäßige Expression von Oviductin-mRNA (Merchan et al. 2007). Auch beim Hamster wird Oviductin während des Zyklus kontinuierlich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene exprimiert (McBride et al. 2004, Komiya et al. 1996, Paquette et al. 1995). Mit Ausnahme von Ratte und Pferd konnte in allen bis jetzt untersuchten Säugetierarten die Synthese von Oviductin nachgewiesen werden. Bei Ratte und Pferd liegt Oviductin dagegen als Pseudogen vor und dient damit nicht mehr als Vorlage für ein funktionales Protein (Tian et al. 2009, Mugnier et al. 2009). Obwohl Oviductin als eileiterspezifisches Glykoprotein beschrieben ist, konnte im Kaninchen die Expression von Oviductin-mRNA im Uterus sowie im Ovar und beim Menschen im Endometrium nachgewiesen werden (Merchan et al. 2007, Punyadeera et al. 2005). Allerdings war die Expression von Oviductin im Uterus und Ovar von Kaninchen etwa 5000-mal niedriger als die Expression im Eileiter (Merchan et al. 2007).

Interaktion mit Eizellen

Die Bindung von Oviductin an Eizellen während des Transports durch den Eileiter konnte bei allen bisher untersuchten Säugetieren nachgewiesen werden. 1985 identifizierten Kapur and Johnson bei der Maus ein Glykoprotein, das an ovulierte Eizellen und frühe Embryonen, aber nicht an Eizellen, welche direkt aus dem Ovar isoliert wurden, gebunden hatte. Da an solchen präovulatorischen Eizellen nach der Inkubation in Eileiterflüssigkeit das Glykoprotein ebenfalls nachgewiesen werden konnte, vermuteten Kapur and Johnson das Eileiterepithel als primären Syntheseort (Kapur and Johnson 1985). In nachfolgenden Studien wurde die Interaktion von Oviductin und Eizelle bei zahlreichen Spezies bestätigt. Oviductin bindet an die Zona pellucida (ZP) bzw. den perivitellinen Raum bei Pavian (Fazleabas and Verhage 1986, Boice et al. 1990), Rind (Wegner 1991, Boice et al. 1992), Schaf (Gandolfi et al. 1991), Schwein (Buhi et al. 1993) und Hamster (Leveille et al. 1987, Robitaille et al. 1988). Bei Pavian, Hamster und Schaf bindet

Oviductin auch an die Membran von Blastomeren früher Embryonen (Boice et al. 1990, Kan et al. 1993, Gandolfi et al. 1991) und konnte bei Pavian und Hamster mit Hilfe der Immunogoldmarkierung sogar im Zytosol der Blastomeren detektiert werden. Hier wurde das Protein vor allem in Endosomen und Lysosomen lokalisiert (Boice et al. 1990, Kan et al. 1993). Neuere Untersuchungen am Schwein vermuten eine Beteiligung von Oviductin am sogenannten „pre-fertilization zona pellucida hardening“ (Coy and Aviles 2009). Bei In-vitro-Befruchtungen beim Schwein kommt es zu Polyspermieraten von bis zu 65%, während die In-vivo-Befruchtung Polyspermieraten von ca. 28% aufweist (Wang et al. 1998). Auch bei anderen Tierarten gibt es Polyspermie in In-vitro-Systemen. Beim Rind liegt die Rate zwischen 5%-45% (Iwata et al. 2008), bei Schaf und Ziege bei ca. 20% (Slavik et al. 2005, Mogas et al. 1997). Um Mehrfachbefruchtungen zu verhindern, kommt es bei Säugetiereizellen in-vivo nach dem ersten Kontakt mit einem Spermium und der Fusion mit der Eizellmembran zur Kortikalreaktion, bei der kortikale Granulae der Eizelle mit der Plasmamembran verschmelzen und durch Exozytose Enzyme sowie Proteoglykane in den perivitellinen Raum abgeben. Die ZP härtet aus und wirkt als Block gegen Polyspermie (Campbell and Reece 2003). Doch obwohl beim Schwein diese Reaktionen nach der IVF sowohl bei in-vivo gereiften Eizellen aus dem Eileiter als auch bei in-vitro gereiften Eizellen gleich ablaufen, kommt es dennoch bei in-vitro gereiften Eizellen zu einer höheren Polyspermierate als in-vivo (Wang et al. 1998). Yang and Yanagimachi beobachteten, dass sich die Morphologie der ZP von präovulatorischen porzinen Eizellen nach der Inkubation in Eileiterflüssigkeit an die der Eizellen aus dem Eileiter angleicht (Yang and Yanagimachi 1989). Sie schlussfolgerten, dass im Eileiter „zona-verändernde“ Faktoren, wahrscheinlich Glykoproteine, vorhanden sein müssen. Die Bindung von Oviductin an die ZP und die Lokalisierung im perivitellinen Raum führten bei Coy et al. zu der Vermutung, dass Oviductin an dieser „Reifung“ der ZP im Eileiter beteiligt sein könnte und damit, unabhängig von der Kortikalreaktion, zu einem zusätzlichen Schutz vor Polyspermie führt (Coy and Aviles 2009). Der Aufenthalt von Eizellen im Eileiter führt vor allem zu einer erhöhten Proteolyseresistenz der ZP. Beim Rind dauert es 0-20 Minuten bis die ZP von in-vitro gereiften bzw. präovulatorischen Eizellen vollständig von Pronase verdaut wird. Bei Eizellen, die nach der Ovulation aus dem Eileiter entnommen wurden, dauert es dagegen 2-24 Stunden (Coy et al. 2008a, Katska et al. 1989). Beim Schwein erhöht sich die Dauer der Resistenz von ca. 1,5 Minuten auf 228 Minuten. Inkubiert man in-vitro gereifte porzine Eizellen mit Eileiterflüssigkeit und führt dann eine IVF aus, kommt es bei gleichbleibender Penetrationsrate zu einer signifikant niedrigeren Polyspermierate als in der Kontrollgruppe (Coy et al. 2008a).

Interaktion mit Spermien

Bei der Bindung von Oviductin an Spermien gibt es zwischen den Arten Unterschiede. Beim Hamster wurde Oviductin vor allem an der akrosomalen Kappe und in der postakrosomalen Region nachgewiesen (Boatman and Magnoni 1995, Kimura et al. 1994). Bei kapazitierten Spermien ist in diesen Bereichen der Spermienmembran signifikant mehr Oviductin gebunden, wohingegen nach Induktion der Akrosomenreaktion die postakrosomale Region kaum noch Oviductin gebunden hat (Kan and Esperanzate 2006). Beim Rind konnte Oviductin im Bereich des gesamten Spermienkopfes und des Mittelstücks detektiert werden (King et al. 1994). Bovine Spermien, die in Medium mit Oviductin inkubiert wurden, wiesen eine signifikant höhere Kapazitationsrate auf als Spermien in einem Medium ohne Oviductin (King et al. 1994). Abe et al. fanden nach Inkubation mit aufgereinigtem Oviductin eine bessere Lebensfähigkeit und erhöhte Motilität boviner Spermien (Abe et al. 1995). Im Gegensatz zu Hamster und Rind konnte bei humanen Spermien keine Bindung von Oviductin nachgewiesen werden (Reuter et al. 1994).

Einfluss von Oviductin auf Befruchtung und Embryonalentwicklung

Beim Schwein führt die Inkubation in-vitro gereifter Eizellen mit aufgereinigtem Oviductin vor der IVF zu einer signifikant niedrigeren Polyspermierate, da weniger Spermien an die Eizelle binden, sowie zu einer erhöhten Befruchtungsrate (McCauley et al. 2003, Kouba et al. 2000). Interessanterweise sinkt die Polyspermie in gleichem Maß, wenn entweder Eizellen oder Spermien mit Oviductin inkubiert werden. Ein synergistischer Effekt, wenn sowohl Eizellen als auch Spermien vorinkubiert wurden, konnte nicht beobachtet werden. Um einen Effekt von Oviductin auf die Embryonalentwicklung unabhängig von der Befruchtung zu testen, wurden frühe Embryonen nach In-vitro-Reifung der Eizellen und nachfolgender IVF in Oviductin-freiem Medium in oviductinhaltiges Kulturmedium umgesetzt (McCauley et al. 2003). Diese Embryonen zeigten eine signifikant höhere Teilungsrate sowie eine höhere Blastozystenrate als die Kontrollgruppe in Oviductin-freiem Medium (McCauley et al. 2003). Auch beim Schaf kommt es zu einer verbesserten Teilungsrate und es entwickeln sich mehr Blastozysten, wenn Oviductin zur IVF zugegeben wird (Hill et al. 1996b). Ein embryotropher Effekt wie beim Schwein konnte jedoch nicht beobachtet werden, wenn Oviductin erst nach der IVF supplementiert wurde (Hill et al. 1996a). Die Inkubation boviner Eizellen mit Oviductin vor der IVF führt ebenfalls zu besseren Befruchtungsraten. Die Inkubation von Spermien mit Oviductin hat beim Rind im Gegensatz zum Schwein allerdings keinen Einfluss auf die Befruchtung (Martus et al. 1998). Sowohl bei Schwein als auch bei Rind konnten diese biologischen Effekte mit dem Einsatz spezifischer Antikörper gegen Oviductin geblockt werden (Kouba et al. 2000, Martus et al. 1998). Pradeep et

al. fanden bei Ziegen einen konzentrationsabhängigen Effekt von Oviductin auf Befruchtung und Embryonalentwicklung. Die Zugabe von 10 µg/ml Oviductin während der In-vitro-Reifung der Eizellen, der IVF und der Kultivierung der Embryonen führte zu signifikant höheren Teilungs-, Morula- und Blastozystenraten, wohingegen Konzentrationen von 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml keinen größeren Effekt mehr zeigten (Pradeep et al. 2011).

Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, die Expression und Synthese des felines Oviductins während des Zyklus zu analysieren und in funktionellen In-vitro-Versuchen den Einfluss des Proteins auf die Befruchtung und frühe Embryonalentwicklung bei der Hauskatze zu untersuchen. Aufgrund der schlechten Verfügbarkeit von nativem felines Oviductin sollte das Glykoprotein für die funktionellen Versuche in einer Hamsterzelllinie rekombinant hergestellt werden. Die Produktion von nicht-glykosyliertem rekombinanten Oviductin in *E.coli* sollte als Kontrolle für den Einfluss der Glykosylierung auf reproduktionsbiologische Funktionen dienen. Bei positiven Effekten von Oviductin auf die In-vitro-Produktion feline Embryonen ergibt sich die Chance, durch Zugabe des rekombinanten Oviductins, auch die IVP anderer Feliden zu verbessern und so einen Beitrag zur Verbesserung assistierter Reproduktionstechniken für bedrohte Katzenarten leisten zu können.

Zusammenfassung der Artikel

Artikel 1*:

Alexandra Hachen, Katarina Jewgenow & Beate C. Braun

Sequence analysis of feline Oviductin and its expression during the estrous cycle in the domestic cat (*Felis catus*)

In dieser Arbeit wurde die vollständige Gen-Sequenz des feline Oviductins identifiziert und dessen Expression während verschiedener Zyklusphasen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht. Eileiter und Eierstöcke erhielten wir nach Routinekastrationen von Hauskatzen sowie wildlebenden Katzen aus dem Tierheim Berlin. Für die Sequenzanalyse wurde RNA aus vier Eileitern isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe der PCR wurden insgesamt vier überlappende Fragmente des feline Oviductins amplifiziert, die am Ende zu einer vollständigen Sequenz zusammengesetzt werden konnten.

Für die Untersuchung der Expression während des Zyklus auf mRNA-Ebene wurden Eileiter anhand der Morphologie der dazugehörigen Eierstöcke in fünf verschiedene Zyklusphasen eingeordnet: Anöstrus bzw. inaktiv (keine Follikel auf dem Eierstock sichtbar), Proöstrus bzw. frühe Follikelphase (Follikel 1-2 mm), Östrus bzw. späte Follikelphase (Follikel > 2 mm), frisch ovuliert (ein oder mehrere corpora hämorrhagica sichtbar) und Gelbkörperphase (ein oder mehrere Gelbkörper sichtbar). Mit Hilfe der qPCR wurde die Expression von Oviductin sowohl in der Ampulle als auch im Isthmus analysiert. Neben Oviductin wurden zusätzlich drei Referenzgene für die Normalisierung der Expression amplifiziert. Die Quantifizierung der mRNA-Kopien erfolgte durch eine Standardkurve mit Plasmid-DNA aus klonierter Oviductin cDNA bzw. klonierten cDNA-Abschnitten der Referenzgene.

Die Untersuchung der Expression während des Zyklus auf Protein-Ebene erfolgte mit Hilfe der Immunhistochemie auf Eileitergewebeschnitten.

Die Ergebnisse dieser Studie waren:

1. Die feline Oviductinsequenz besteht aus 1677 Basenpaaren, die für ein 558 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 62 kDa kodieren. Die abgeleitete Proteinsequenz besitzt eine potentielle N-glykosidische sowie sechs potentielle O-glykosidische Bindungsstellen, die alle im C-terminalen Bereich liegen. Die Übereinstimmung der Sequenz mit anderen Spezies liegt in der N-terminalen Region des Proteins (Aminosäure 1-385) bei 74%-80%, während die Übereinstimmung im C-terminalen Bereich (Aminosäure 386-558) bei 24%-48% liegt.

2. Bei der Hauskatze zeigte sich eine zyklus-abhängige mRNA-Expression mit maximaler Expression während der frühen und späten Follikelphase. In den anderen Zyklusstadien sank die Expression signifikant ab. Während des Zyklus bestand kein Unterschied in der Expression zwischen Ampulle und Isthmus, außer in der frühen Follikelphase, in welcher die mRNA-Expression in der Ampulle höher war als im Isthmus.
3. Die zyklus-abhängige mRNA-Expression spiegelte sich auch auf Proteinebene wider. Die stärksten immunhistochemischen Signale fanden sich während der Follikelphasen (Proöstrus/Östrus). Sowohl in der Ampulle als auch im Isthmus waren an der apikalen Seite der Drüsenzellen des Eileiterepithels typische, braun gefärbte sekretorische Vesikel zu sehen. Diese Immunreaktion war in keiner der drei anderen Zyklusphasen zu finden.

Mitwirkung der Autoren:

Alexandra Hachen:	Sammeln des Probenmaterials, Erstellen der Laborprotokolle, Durchführen der Versuche, Analyse und Auswertung der Ergebnisse sowie Schreiben des Manuskripts
Katarina Jewgenow:	Betreuung des Projekts, Diskussion der Projektplanung und Korrektur des Manuskripts
Beate C. Braun:	Erstellen des Konzepts und Betreuung des Projekts, Erstellen der Laborprotokolle, Analyse der Ergebnisse, Korrektur des Manuskripts

* Teile des Manuskripts basieren auf der Diplomarbeit von Alexandra Kaffenberger („Charakterisierung des Oviductins der Hauskatze (*Felis catus*)“)

Dazu gehören das Sammeln des Probenmaterials, die Identifizierung der Gen-Sequenz und erste immunhistochemische Untersuchungen zur Oviductinexpression während des Zyklus.

Artikel 2:

Alexandra Hachen, Katarina Jewgenow, Eberhard Krause & Beate C. Braun

Recombinant feline Oviductin - a powerful tool for functional IVF studies in the domestic cat

In dieser Arbeit wurde felines Oviductin rekombinant hergestellt, um unabhängig von schwer verfügbarem nativem Protein zu sein. Das rekombinante Oviductin sollte anschließend in

funktionellen Versuchen eingesetzt werden. Für die nicht-glykosylierte Variante wurde die Oviductin cDNA-Sequenz zunächst in einen Vektor (pET-21b) kloniert und in *E.coli* (JM109) transformiert. Dieser Vektor trägt eine C-terminale Polyhistidinsequenz (His-Tag), die für die spätere Aufreinigung und Western Blot Analyse eine Rolle spielt. Nach einer Kontroll-Sequenzierung wurden Plasmide mit der gewünschten Sequenz in einen *E.coli* Expressionsstamm (BL21DE3) transformiert. Diese Zellen wurden kultiviert und die rekombinante Expression wurde bei einer optischen Dichte von 550 nm mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Für die Isolierung des rekombinanten Proteins wurden die Bakterienzellen in einen Lysepuffer überführt und anschließend mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen. Die Aufreinigung des Lysats erfolgte zunächst über eine Anionenaustauschchromatographie. Oviductin enthaltende Fraktionen wurden dann nochmals über eine Metallaffinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt. Hierbei bindet der His-Tag des rekombinanten Oviductins an eine Nickelionen-haltige Säule und das gebundene Protein wird mit Hilfe eines steigenden Imidazol-Gradienten wieder eluiert. Die Auftrennung und Analyse der Proteinfractionen erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot, bei dem ein anti-His Antikörper verwendet wurde.

Für die glykosylierte Variante wurde die Oviductinsequenz aus dem pET-21b-Vektor geschnitten und in einen Expressionsvektor (pSecTag/HygroA) für die rekombinante Expression in eukaryotischen Zellen ligiert. Dieser Vektor trägt eine Sequenz für Proteinsekretion, die dazu führt, dass rekombinantes Protein aus der Zelle in das Kulturmedium abgegeben wird. Der Vektor mit korrekt eingebauter Oviductinsequenz wurde in CHO-K1 Zellen transfiziert. Um eine stabile Transfektion zu erreichen, wurden die Zellen in einem Selektionsmedium mit Hygromycin B kultiviert. Für die Isolierung des Oviductins wurden die transfizierten CHO-K1 Zellen in einem serum- und proteinfreien Medium kultiviert. Das Kulturmedium wurde gewonnen, aufkonzentriert und mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt.

Bei beiden Proteinvarianten wurden Proteinbanden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert.

Die Ergebnisse dieser Studie waren:

1. Nicht-glykosyliertes Oviductin wurde im ersten Aufreinigungsschritt mit einer NaCl-Konzentration zwischen 400 mM und 700 mM von der Anionenaustauschersäule eluiert. Diese Fraktionen wurden nochmals mit IMAC aufgereinigt. Hier wurde Oviductin mit einer Imidazol-Konzentration zwischen 160 mM und 350 mM von der Säule eluiert. Nach der Induktion von 1 l Bakterienkultur war nach der Aufreinigung ca. 1 mg rekombinant hergestelltes Oviductin (vermutete Reinheit ca. 20%) verfügbar. Die SDS-PAGE der aufgereinigten Fraktionen zeigte eine Bande im erwarteten Bereich von ca. 67 kDa. In der Western Blot Analyse konnte diese Bande als Oviductin identifiziert

werden. Durch massenspektrometrische Analyse wurden in dieser Bande 55 Oviductinpeptide, die ca. 72% der gesamten Proteinsequenz abdecken, identifiziert.

2. Die SDS-PAGE des Kulturmediums transfizierter CHO-K1 Zellen zeigte Proteinbanden im Bereich von ca. 70 kDa, 85 kDa und 170 kDa. Der Western Blot zeigte keine spezifischen Signale, dennoch konnten in den Proteinbanden mittels Massenspektrometrie Oviductinpeptide nachgewiesen werden. So wurden drei Peptide in der 70 kDa Bande, vier Peptide in der 85 kDa Bande und zwei Peptide in der 170 kDa Bande identifiziert. Alle Oviductinpeptide stammten aus der N-terminalen Region des Proteins

Mitwirkung der Autoren:

Alexandra Hachen:	Erstellen der Laborprotokolle, Durchführen der Versuche, Analyse und Auswertung der Ergebnisse sowie Schreiben des Manuskripts
Katarina Jewgenow:	Betreuung des Projekts, Diskussion der Projektplanung und Korrektur des Manuskripts
Eberhard Krause:	Durchführung der massenspektrometrischen Analysen, Durchsicht des Manuskripts
Beate C. Braun:	Erstellen des Konzepts und Betreuung des Projekts, Analyse der Ergebnisse, Korrektur des Manuskripts

Artikel 3:

Romy Hribal*, Alexandra Hachen*, Katarina Jewgenow, Jennifer Zahmel, Lorena Fernandez-Gonzalez & Beate C. Braun

The influence of recombinant feline Oviductin on different aspects of domestic cat (*Felis catus*) IVF and embryo quality

** Die Beiträge beider Autoren sind gleichberechtigt.*

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von rekombinant hergestelltem nicht-glykosylierten Oviductin auf die Bindung von Spermien an die ZP, die IVP sowie die Genexpression in daraus entstandenen Blastozysten untersucht. Die Analyse der Spermien-Zona-Bindung wurde mit Hilfe eines Hemizona Assays (HZA) durchgeführt. Dafür wurden Eizellen mit einem Laser in zwei Hälften geteilt, das Ooplasma entfernt und beide Zonahälften bis zum Versuch bei -80°C gelagert. Im Hemizona Assay wurde eine Hälfte mit Spermien und nicht-glykosyliertem Oviductin (100 µg/ml) inkubiert, die dazugehörige zweite Hälfte wurde mit Spermien ohne

Oviductin inkubiert. Nach der Färbung der Zonahälften wurden die gebundenen Spermien mikroskopisch ausgezählt.

Für die IVP-Versuche wurden Kumulus-Oocyten-Komplexe isoliert und für 24 Stunden gereift. Anschließend wurde eine IVF mit nicht-glykosyliertem Oviductin bzw. ohne Oviductin durchgeführt. Nach 18 h wurden die Eizellen beider Gruppen in Oviductin-freies Kulturmedium umgesetzt und täglich die Entwicklung beurteilt.

Die daraus entstandenen Blastocysten wurden in bei -80°C gelagert um den Einfluss von Oviductin während der IVF auf die Expression verschiedener entwicklungsbiologisch relevanter Gene zu untersuchen. Die mRNA einzelner Embryonen aus beiden Gruppen wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-qPCR analysiert.

Die Ergebnisse dieser Studie waren:

1. Insgesamt wurden 50 Zonae pellucidae geteilt und mit Spermien und Oviductin bzw. ohne Oviductin inkubiert. Die Zugabe von Oviductin führte zu signifikant mehr gebundenen Spermien. Im Durchschnitt konnten $161,3 \pm 113,4$ gebundene Spermien (+Oviductin) und $109,4 \pm 95,4$ gebundene Spermien (-Oviductin) ausgezählt werden.
2. Die Zugabe von rekombinantem Oviductin zur IVF hatte keinen Effekt auf Teilungs-, Morula- oder Blastozystenraten.
3. Die Expression acht verschiedener Gene (DNMT1, DNMT3A, OCT4, HSP70, BAX, GAPDH, GJA1, IGF1R) wurde in 16 (+Oviductin) und 13 (-Oviductin) einzelnen Blastozysten untersucht. Blastozysten, die sich aus der IVF +Oviductin entwickelten, zeigte eine signifikant höhere Expression von GJA1. Bei allen anderen Genen zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Mitwirkung der Autoren:

Romy Hribal:	Erstellen der Laborprotokolle, Durchführen des HZA, der IVP-Versuche und embryonalen Genexpression, Analyse und Auswertung der Ergebnisse sowie Schreiben des Manuskripts
Alexandra Hachen:	Erstellen der Laborprotokolle, Durchführen des HZA und IVP-Versuche, Analyse und Auswertung der Ergebnisse, Schreiben des Manuskripts
Katarina Jewgenow:	Betreuung des Projekts, Diskussion der Projektplanung und Korrektur des Manuskripts
Jennifer Zahmel:	Durchführen des HZA, Durchsicht des Manuskripts

Lorena

Fernandez-Gonzalez: Durchführen der IVP-Versuche

Beate C. Braun: Erstellen des Konzepts und Betreuung des Projekts, Analyse der Ergebnisse, Korrektur des Manuskripts

Diskussion

Der Eileiter von Säugetieren ist an einer Vielzahl wichtiger Prozesse beteiligt, die für die Physiologie der Gameten, die Befruchtung und die frühe Embryonalentwicklung nötig sind (Hunter 1998). Das Milieu im Eileiter setzt sich aus Sekreten des Epithels sowie des Blutplasmas zusammen und enthält Stoffwechselkomponenten wie Glucose, Laktat, Pyruvat und Aminosäuren, deren Konzentration sich von der des Blutplasmas oder der Uterusflüssigkeit unterscheidet (Hugentobler 2008, Leese et al. 2008, Li et al. 2007). Zahlreiche Proteine konnten bis jetzt in der Eileiterflüssigkeit detektiert werden und es werden immer noch neue Komponenten gefunden. Diese Proteine gehören zu unterschiedlichsten Gruppen wie Wachstumsfaktoren, Hormone und Rezeptoren, Proteasen und Proteaseinhibitoren, antioxidative Substanzen, Glykosidasen und Glykosyltransferasen, Proteoglykane und Proteine der Immunabwehr. Die Aktivität mancher Proteine, z.B. der Glykosidasen, ist östrogenabhängig und ändert sich während des Zyklus (Carrasco et al. 2008a, Carrasco et al. 2008b) und einige Proteine liegen in der Ampulle in einer anderen Konzentration vor als im Isthmus. Eizellen, Spermien und Embryonen befinden sich zu unterschiedlichen Zeiten an verschiedenen Stellen innerhalb des Eileiters und es scheint, dass die Zusammensetzung der Eileiterflüssigkeit ein dynamischer Prozess ist, welcher vor allem hormonell, aber auch durch die Gameten selbst beeinflusst und modifiziert wird (Kodithuwakku et al. 2007, Georgiou et al. 2007). Die Ko-Kultur mit Eileiterepithelzellen bzw. Eileitergewebe während der In-vitro-Produktion von Embryonen hat bei mehreren Spezies und auch bei der Hauskatze einen positiven Einfluss auf Befruchtung, Teilungsraten und Blastozystenentwicklung (Rizos et al. 2010, Xu et al. 2004, Lengwinat et al. 1993). Allerdings ist die Zugabe somatischer Zellen oder Gewebe aufgrund der komplexen Methodik, ungenügender Wiederholbarkeit sowie Kontaminationsrisiken für die routinemäßige In-vitro-Produktion von Embryonen nicht praktikabel. Trotzdem ist das Ziel, die Bedingungen der IVP soweit wie möglich an die In-vivo-Situation anzupassen.

Felines Oviductin

Oviductin ist ein Glykoprotein, das in den meisten Spezies exklusiv im Eileiter exprimiert wird (Araki et al. 2003, Verhage et al. 1998). Während des Östrus gehört es zu den am stärksten synthetisierten Proteinen des sekretorischen Epithels im Eileiter (Mondejar et al. 2012). Diese gewebespezifische Expression, die östrogenabhängige Regulation sowie die hochkonservierte N-terminale Region von Oviductin sprechen dafür, dass dieses Glykoprotein eine bedeutende biologische Rolle in der Reproduktion spielt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, felines Oviductin näher zu charakterisieren, die Expression während des Zyklus zu analysieren, das Protein rekombinant herzustellen und zu testen, ob rekombinant hergestelltes Oviductin einen Einfluss auf die Bindung zwischen Eizelle und Spermien, auf die IVF und/oder auf die frühe Embryonalentwicklung bei der Hauskatze hat.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des felinen Oviductins zeigt im N-terminalen Bereich Übereinstimmungen zu anderen Spezies von ca. 80%, wohingegen der C-Terminus nur zu 24% bis 47% übereinstimmt. In dieser Region befinden sich bei der Hauskatze sechs potenzielle O-glykosidische Bindungsstellen, ähnlich der des Menschen (9 Bindungsstellen) und des Pavians (7 Bindungsstellen). Im Gegensatz dazu besitzen Ziege und Maus 21 bzw. 50 solcher Glykosilierungsstellen (Pradeep et al. 2011). Diese Bindungsstellen im C-Terminus befinden sich vor allem in den Serin/Threonin-reichen tandem-repeat Sequenzen. Hamsterooviductin enthält sechs solcher tandem-repeats bestehend aus jeweils 15 Aminosäuren (Malette et al. 1995a). Im C-Terminus von Mensch, Pavian und Rhesusaffe findet man vier tandem-repeats, bei der Maus sogar 21 Sequenzen bestehend aus sieben sich wiederholenden Aminosäuren. Im Gegensatz dazu zeigt Oviductin von Rind, Schaf und Schwein nur unvollständige oder gar keine tandem-repeats (Malette et al. 1995b). Auch bei der Hauskatze liegen lediglich einige verkürzte tandem-repeats bestehend aus zwei bis drei Aminosäuren vor. Der Grad und die Zusammensetzung der gebundenen Kohlenhydratketten von Oviductin unterscheiden sich stark zwischen den Tierarten. Im Rind konnten insgesamt 16 Oligosaccharidketten bestehend aus Galaktose, Mannose, N-acetyl-D-Galaktosamin, Fucose und Sialinsäure identifiziert werden (Satoh et al. 1995). Beim Hamster finden sich vor allem O-glykosidisch gebundene Kohlenhydratketten mit endständigem N-acetyl-D-Galaktosamin bzw. N-acetyl-Neuraminsäure (Malette and Bleau 1993). Man vermutet, dass diese Heterogenität der Glykosylierung zwischen den Tierarten über die Verfügbarkeit bestimmter Glykosyltransferasen reguliert wird. Bei Hamster wird sowohl Oviductin mRNA als auch Protein während des gesamten Zyklus kontinuierlich exprimiert (Komiya et al. 1996). Allerdings findet man im Eileiter vom Hamster mehrere Varianten von Oviductin, deren Molekulargewicht zwischen 160 und 350 kDa liegt (McBride et al. 2004). McBride et al. konnten zeigen, dass die Aktivität spezifischer Glykosyltransferasen im Hamster zyklusabhängig reguliert wird und vor allem während des Proöstrus und Östrus ein hohes Level erreicht (McBride et al. 2005). Zu einem ähnlichen

Ergebnis kamen auch Carrasco et al.. Sowohl bei Schwein als auch bei Rind konnten sie während der frühen und späten Follikelphase eine höhere Enzymaktivität bestimmter Glykosidasen feststellen als in der Lutealphase (Carrasco et al. 2008a, Carrasco et al. 2008b). Die verschiedenen speziesspezifischen Effekte von Oviductin könnten nicht nur einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Glykosylierung sondern auch einem sich ändernden Glykosylierungsmuster während des Zyklus zugrunde liegen. Über die Zusammensetzung der Kohlenhydratketten des felines Oviductins gibt es noch keine Informationen. In unseren Studien konnten wir bei der rekombinanten Expression in CHO-Zellen mittels massenspektrometrischer Analyse Oviductinpeptide in verschiedenen höhermolekularen Proteinbanden identifizieren (70 kDa, 85 kDa, 170 kDa). Ein Molekulargewicht des felines glykosylierten Oviductins von ca. 170 kDa stimmt mit einer Untersuchung von Robitaille and Bleau überein, die mit einem Antikörper gegen Hamsteroviductin ein Signal an ovulierten Eizellen bei der Katze nachweisen konnten. Isolierte Zonae mitsamt assoziierter Proteine wurden dort mittels SDS-PAGE aufgetrennt und führten zu einem Signal im Western Blot im Bereich von 160 kDa (Robitaille et al. 1988).

Bei der Maus scheint die C-terminale Region von Oviductin eine biologische Rolle in der frühen Embryonalentwicklung zu spielen. Die Inkubation früher In-vivo-Mausembryonen (spätes 1-Zell-Stadium) mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von Kaninchenoviductin im Kulturmedium führt zu einem Arrest der Mausembryonen im 2-Zell-Stadium (Yong et al. 2002). Dieser Arrest kommt häufig bei in-vitro produzierten Embryonen vor. Als Ursache vermutet man einen fehlgeschlagenen Übergang von maternaler zu embryonaler Kontrolle der Entwicklung. Oviductin könnte bei der Induktion dieser „Umschaltung“ bei der Maus beteiligt sein.

Die Ko-Inkubation von aufgereinigtem Oviductin und Rinderspermien erhöhen deren Viabilität und Motilität (Satoh et al. 1995). Behandelt man bovines Oviductin mit dem Enzym Neuraminidase werden die endständig an Oligosaccharidketten gebundenen Sialinsäuren entfernt und der biologische Effekt auf die Lebensfähigkeit boviner Spermien ist signifikant erniedrigt (Satoh et al. 1995). Sialinsäuren sind negativ geladen und durch ihre endständige Position prädestiniert für die Interaktion von Oviductin mit anderen Molekülen. Trotz dieser Hinweise auf eine potenzielle biologische Rolle des glykosylierten carboxyterminalen Bereichs von Oviductin sind die Mechanismen der Interaktion zwischen Oviductin und Gameten bzw. frühen Embryonen und die beteiligten Rezeptormoleküle völlig unklar.

Im Gegensatz zu diesem höchst variablen Bereich, ist der N-Terminus von Oviductin zwischen allen Spezies stark konserviert (Aviles et al. 2010, Buhi 2002). Dieser Bereich weist zahlreiche Übereinstimmungen zu dem Enzym Chitinase auf, das in Bakterien und Fadenwurmlarven zu finden ist (Henrissat 1991). Chitinasen sind meist extrazellulär lokalisierte Glykoproteine und gehören ebenso wie Oviductin zur Familie der Glykosylhydrolasen. Oviductin besitzt keine Enzymfunktion, da im Bereich des möglichen aktiven Zentrums zwei Aminosäuren substituiert sind, die für die glykohydrolytische Aktivität notwendig sind (Malette et al. 1995b). Dies gilt für alle bisher untersuchten Oviductinsequenzen. Chitinasen besitzen einige „chitin-binding“

Domänen, die ebenfalls eine hohe Übereinstimmung zu Oviductin zeigen. Mit diesen Domänen bindet das Enzym zum Beispiel an die Zellwand von Hefezellen, um Chitinfasern zu hydrolysieren (Kuranda and Robbins 1991). Chitin ist ein Polysaccharid aus N-Acetylglucosamin-Einheiten und kommt nicht in Säugetieren vor. Allerdings enthalten die Proteine der Zona pellucida aller bis jetzt untersuchten Spezies N-Acetylglucosamin-Reste (Sinowatz et al. 2001), die als Liganden für Oviductinmoleküle dienen könnten. Dafür spricht, dass auch eine speziesübergreifende Interaktion zwischen Oviductin und Eizellen beobachtet werden konnte. So bindet bovines Oviductin auch an die ZP vom Schwein (Coy et al. 2008a) während humanes Oviductin an Hamstereizellen (Reuter et al. 1994) und Oviductin vom Pavian an humane Eizellen bindet (O'Day-Bowman et al. 1996).

Ebenfalls im N-Terminus lokalisiert, ist bei der Katze eine potenzielle „heparin-binding site“. Solch eine Bindungsstelle für Heparin findet sich auch in der Oviductinsequenz vom Schwein (Buhi et al. 1996). Heparin ist ein Glykosaminoglykan und soll die Bindung von Oviductin an die ZP während des pre-fertilization hardenings stabilisieren (Coy et al. 2008a). Coy et al. beobachteten, dass die Modifikation der ZP durch die Eileiterflüssigkeit reversibel ist, wenn Eizellen nach der Inkubation mit Eileiterflüssigkeit und Heparin in ein Kulturmedium ohne Heparin umgesetzt wurden. In diesem Fall wurde die ZP umso schneller enzymatisch verdaut je länger die Eizellen in Heparin-freiem Medium waren. Zusätzlich konnte, nach der Entnahme der Eizellen, in diesem Medium das ungebundene Oviductin mittels SDS-PAGE und Massenspektrometrie identifiziert werden (Coy et al. 2008a). Die Reversibilität dieser schützenden Glykoproteinschicht scheint sinnvoll, denn zu einem späteren Zeitpunkt muss die ZP sensibel für proteolytische Enzyme sein, um das Schlüpfen der Blastozyste zu ermöglichen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Oviductin als „bifunktionales“ Protein bezeichnet werden könnte. Auf der einen Seite eine stark konservierte Region mit kohlenhydrat-bindenden Domänen, die eventuell aus einer Familie prokaryotischer Enzyme stammen, sowie einer potenziellen Bindungsstelle für Heparin, die für die Stabilisierung einer Oviductin-Zona-Bindung verantwortlich sein könnte und auf der anderen Seite einen sehr variablen, spezies-spezifisch glykosylierten, mucin-ähnlichen Bereich, welcher durch umfangreiche Kohlenhydrat-Seitenketten der Eizelle Schutz bieten könnte vor Proteolyse, Interaktion mit anderen Molekülen, Adhäsion an das Eileiterepithel oder Aktionen des mütterlichen Immunsystems.

Expression des felines Oviductins

Die Expression von Oviductin scheint auch bei der Hauskatze sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene östrogenabhängig zu sein. In der frühen Follikelphase, dem Proöstrus, steigt die Konzentration von Östrogen im Blut bei der Katze langsam an und erreicht ihr Maximum

während des Östrus bzw. der späten Follikelphase. Auf immunhistochemisch analysierten Gewebeschnitten sind in diesen beiden Phasen in den Drüsenzellen des Eileiterepithels angefärbte sekretorische Vesikel mit Oviductin zu sehen. Oviductin wird bei der Hauskatze sowohl in der Ampulle als auch im Isthmus synthetisiert. Auch beim Menschen wird Oviductin im gesamten Eileiter exprimiert (O'Day-Bowman et al. 1995). Im Gegensatz dazu konnte im Schaf das Protein nur im Trichter und in der Ampulle nachgewiesen werden (DeSouza and Murray 1995) und beim Schwein findet man in der Ampulle eine signifikant höhere mRNA-Expression von Oviductin als im Isthmus (Buhi et al. 1996).

Nach der Ovulation verändert sich bei der Katze die Morphologie des Eileiterepithels unter Einfluss von Progesteron und es ist in der Phase „frisch ovuliert“ keine Expression von Oviductin mehr nachweisbar. Bei der Hauskatze wird die Ovulation normalerweise erst durch den Deckakt induziert und es stellt sich die Frage, warum Oviductin in unseren Untersuchungen kurz nach der Ovulation bei den immunhistochemischen Untersuchungen nicht mehr nachweisbar war. In der Phase „frisch ovuliert“ sollte die Eizelle gerade erst den Eileiter erreicht haben und eine Interaktion mit Oviductin stattfinden. In der vorliegenden Arbeit wurden die fünf Zyklusphasen anhand der Morphologie der Eierstöcke eingeteilt, wobei die Phase „frisch ovuliert“ die Anwesenheit einer blutigen Ovulationsnarbe, eines corporae hämorrhagicae, erforderte. Eine ähnliche Einteilung findet man auch in einer Arbeit von Freistedt et al., in welcher der Einfluss von Jahreszeit und Ovarstatus auf die In-vitro-Produktion von Katzenembryonen untersucht wurde (Freistedt et al. 2001). Es gibt bei der Katze keinen Hinweis darauf, wie lange diese Ovulationsnarben auf dem entstehenden Gelbkörper zu finden sind. Allerdings zeigen eigene interne Studien, dass ein deutlicher corpora hämorrhagica nicht unbedingt bedeutet, dass die Ovulation erst wenige Tage her ist. Solche Ovulationsnarben waren selbst noch während einer bestehenden Trächtigkeit (ca. Tag 19) auf dem dazugehörigen Eierstock zu sehen. Das bedeutet, dass eventuell einige von uns als „frisch ovuliert“ klassifizierten Eierstöcke bzw. Eileiter eher als „luteal“ eingeteilt werden müssten. Bei der Hauskatze beginnt der Umbau der Follikelzellen zu aktiven Lutealzellen direkt nach der Ovulation. Schon ein bis zwei Tage nach der Ovulation kommt es durch die morphologischen und funktionellen Veränderungen am Follikel zu einem Anstieg der Progesteronkonzentration im Serum (Jewgenow et al. 2012). Die Synthese von Progesteron durch einen funktionellen Gelbkörper führt bei der Katze zu einer rapiden Atrophie und Dedifferenzierung des Eileiterepithels. Sekretorische Vesikel an den Drüsenzellen sind nach zwei Tagen unter Progesteroneinfluss nicht länger sichtbar (Bareither and Verhage 1981). Das heißt, dass wahrscheinlich in manchen Eileitern mit einer sichtbaren blutigen Ovulationsnarbe auf dem dazugehörigen Ovar die Progesteronsynthese schon so aktiv war, dass kein Oviductin mehr exprimiert wurde. Trotz der extremen Wirkung von Progesteron auf das Eileiterepithel und die Oviductinexpression bei der Katze, zeigt der zeitliche Ablauf von Paarung, Ovulation und Befruchtung, dass für die Gameten genügend Zeit bleibt, um mit Oviductin zu interagieren.

Schon ca. drei Stunden nach dem Deckakt findet man Spermien in der uterotubalen Verbindung, die bei der Katze als Spermienreservoir dient. Ungefähr 48 Stunden nach der Paarung erreichen die Spermien die Verbindung zwischen Isthmus und Ampulle, in welcher dann auch die Befruchtung stattfindet (Chatdarong et al. 2004). Zur Ovulation kommt es 25 bis 32 Stunden nach der Paarung und ca. 48 Stunden später beginnt die Progesteronsynthese des Gelbkörpers. Felines Oviductin wird im gesamten Eileiter gleich stark exprimiert und synthetisiert. Das bedeutet, dass vor der Befruchtung ausreichend Zeit für eine mögliche Spermien-Oviductin-Bindung im Isthmus bleibt. Die Eizellen haben ebenfalls mindestens 20 Stunden Zeit, um mit Oviductin zu interagieren bevor es in der Verbindung zwischen Ampulle und Isthmus zur Befruchtung kommt.

Rekombinante Expression von felinem Oviductin

Die rekombinante Expression von Oviductinpeptiden wurde bis jetzt vor allem für die Produktion spezifischer Antikörper angewendet, welche dann in funktionellen Versuchen eingesetzt wurden (McBride et al. 2004, Yong et al. 2002, Natraj et al. 2002). Außer der vorliegenden Arbeit, gibt es lediglich zwei weitere Studien über die rekombinante Expression von Oviductin für funktionelle Versuche. Janjanam et al. stellten Oviductin vom Wasserbüffel (*Bubalus bubalis*) rekombinant in *E.coli* her und untersuchten dessen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von Spermien sowie die Akrosomenreaktion. Sie versahen das rekombinante Protein ebenfalls mit einem His-Tag und nach der Aufreinigung über IMAC erhielten sie aus einem Liter Bakterienkultur ca. 0,8 mg rekombinantes Oviductin (Janjanam et al. 2012). Dies stimmt in etwa mit unserer Ausbeute an felinem rekombinanten Oviductin überein. Aus einem Liter Bakterienkultur konnten wir ca. 1 mg aufgereinigtes Protein gewinnen. Mit dieser Methode kann rekombinantes Oviductin in größeren Mengen hergestellt werden. Da posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung in *E.coli* nicht stattfinden, bietet rekombinantes nicht-glykosyliertes felines Oviductin die Möglichkeit, Eigenschaften des Proteins aufzudecken, die unabhängig von der Glykosylierung sind und möglicherweise eher durch die stark konservierte N-terminale Domäne vermittelt werden. Da in diesem Bereich eine hohe Sequenzhomologie zwischen den Spezies besteht, könnte man erwarten, dass sich auch die damit verbundenen Funktionen zwischen den Spezies ähneln. Um biologischen Effekte von Oviductin bzw. den Einfluss der Kohlenhydrat-Seitenketten untersuchen zu können, musste daher auch eine glykosylierte Variante hergestellt werden.

Für die rekombinante Herstellung von glykosyliertem Oviductin wurden CHO-K1-Zellen mit einem eukaryontischen Expressionsvektor, der die Oviductinsequenz enthielt, transfiziert. Um eine stabile Transfektion zu erreichen, wurde dem Kulturmedium Hygromycin B zugegeben. Hygromycin B gehört zu den Aminoglycosid-Antibiotika. In eukaryontischen Zellen führt es zu

Lesefehlern während der Translation und hemmt damit die Proteinsynthese der Zelle. Das Antibiotikum dient als Mittel zur Selektion transfizierter Zellen, da der eingeschleuste Expressionsvektor pSecTag/HygroA eine Resistenz gegen Hygromycin B trägt. Obwohl die transfizierten Zellen erfolgreich kultiviert, passagiert und konserviert werden konnten, war die Ausbeute an sekretiertem, rekombinantem Oviductin sehr gering. Die massenspektrometrische Analyse der mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennten Proteinbanden aus dem Kulturmedium ergab nur einige wenige Oviductinpeptide, wobei man berücksichtigen muss, dass diese Peptide ausschließlich im N-Terminus von Oviductin lagen. Im C-Terminus wurden keine Peptide gefunden, da dieser Bereich höchstwahrscheinlich glykosyliert vorlag und damit eine Identifizierung mittels Massenspektrometrie sehr schwierig ist. Für die Herstellung von rekombinantem humanen Oviductin transfizierten Yang et al. HEK-293-Zellen mit humaner Oviductin-cDNA und ernteten rekombinantes Protein aus dem Kulturüberstand (Yang et al. 2012). Der Überstand wurde zunächst aufkonzentriert und über eine Kationenaustauschchromatographie aufgetrennt. Die daraus gewonnenen Fraktionen mit Oviductin wurden nochmals aufkonzentriert und in einem letzten Schritt über eine Gelfiltration aufgereinigt. Die Herstellung rekombinanter Glykoproteine ist eine sehr umfangreiche Methode, bei der es mehrere Schwierigkeiten zu überwinden gilt. Bei der Produktion humaner rekombinanter Glykoproteine werden häufig CHO-Zellen eingesetzt da die genetische Manipulation dieser Zellen unproblematisch ist. Zudem entspricht das Glykosylierungsmuster meist dem des nativen humanen Glykoproteins (Morrison et al. 2000, Gu and Wang 1997). Allerdings fehlen im Glykosylierungsapparat von CHO-Zellen einige Enzyme, die für spezifische Glykosylierungsmuster notwendig sind. CHO-Zellen fehlt zum Beispiel die $\alpha 2,6$ -Sialyltransferase, sie können nur $\alpha 2,3$ -gebundene terminale Sialinsäurereste synthetisieren (Paulson et al. 1989). Rinderoviductin besitzt terminal gebundene Sialinsäuren (Satoh et al. 1995) und die stabil transfizierten HEK-Zellen für die Produktion von rekombinantem humanen Oviductin zeigen eine Aktivität von $\alpha 3$ - und $\alpha 6$ -Sialyltransferasen (Yang et al. 2012). Es ist wahrscheinlich, dass auch felines Oviductin endständige Sialinsäuren besitzt. Durch fehlende oder unvollständige Sialinsäurereste könnte es zu Veränderungen der biologischen Eigenschaften von Oviductin kommen. Um dem Glykosylierungsmuster von nativem felinen Oviductin näher zu kommen, müsste man zukünftig eventuell einen anderen Zelltyp wählen. Doch nicht nur die Zellen selbst, auch die Kulturbedingungen beeinflussen die Zusammensetzung und Struktur der Kohlenhydratseitenketten eines Glykoproteins (Yang and Butler 2000). Die potentiellen Glykosylierungsstellen können vollständig, teilweise oder gar nicht glykosyliert sein (Parekh and Patel 1992). Dies kann zu einer Reihe von Protein-Isoformen führen. In der vorliegenden Arbeit wurden die CHO-Zellen in einem vom Hersteller empfohlenen Medium kultiviert. Auch nach der Transfektion wurde dieses Medium inklusive Antibiotikum verwendet. Der Zellkulturüberstand wurde nicht auf Aktivität von Glykosidasen oder Proteasen getestet. Diese Enzyme werden bei der Zelllyse freigesetzt und können das sekretierte,

rekombinante Protein angreifen. Für die Ernte des Zellkulturüberstandes wurden die Zellen zudem 2-3 Tage in einem serum- und proteinfreien Medium kultiviert, um die Verunreinigung des Zellkulturüberstandes mit Serumproteinen gering zu halten. Diese suboptimalen Bedingungen und die fehlenden Proteaseinhibitoren aus dem fötalen Kälberserum könnten zu der beobachteten schlechten Ausbeute an rekombinantem Oviductin sowie einer postsekretorischen Modifizierung geführt haben. Um eine korrekte intrazelluläre Prozessierung der Oligosaccharide von Oviductin und die Sekretion in das Kulturmedium zu gewährleisten, sollten zukünftig die Bedingungen für die Zellen optimal gestaltet und eventuell auf die Verwendung eines serum- und proteinfreien Mediums verzichtet werden. Die Verunreinigung mit Proteinen aus dem Kulturmedium müsste mit nachfolgenden Aufreinigungsschritten beseitigt werden.

Funktionelle Versuche mit felinem Oviductin

In den hier präsentierten funktionellen Versuchen wurde der Einfluss des rekombinanten nicht-glykosylierten felinen Oviductins auf die Bindung zwischen Spermien und ZP, die In-vitro-Produktion von Embryonen und die Genexpression in Blastozysten untersucht. Die Inkubation von felinen Spermien und einer Zonahälfte mit Oviductin führte zu einer signifikant höheren Anzahl gebundener Spermien als bei der zweiten Zonahälfte, die ohne Oviductin mit Spermien inkubiert wurde. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen auch O'Day-Bowman et al., die ebenfalls mit einem Hemizona Assay den Einfluss von humanem Oviductin auf die Spermien-Zona-Bindung untersuchten (O'Day-Bowman et al. 1996). Allerdings wurde in dieser Studie natives glykosyliertes Oviductin eingesetzt, welches aus Eileiterflüssigkeit gewonnen wurde. Zudem wurden die Zonahälften vor der Zugabe der Spermien für 24 h mit Oviductin vorinkubiert. O'Day-Bowman et al. konnten die Bindung von Oviductin an humane Eizellen mittels Immunofluoreszenz nachweisen, an den Spermien dagegen war kein Oviductin gebunden. Sie schlussfolgerten, dass die Bindung von Oviductin an die ZP entweder zu einer Modifizierung von Zonaproteinen führt und damit eventuell Rezeptoren bzw. Bindungsstellen für die Spermien frei werden oder dass Oviductin selbst mit seinen spezies-spezifischen Kohlenhydratketten die Interaktion zwischen Spermien und ZP vermittelt (O'Day-Bowman et al. 1996). Im Gegensatz dazu binden beim Schwein signifikant weniger Spermien an die ZP, wenn die Eizelle vorher mit Oviductin inkubiert wurde (Coy et al. 2008a), was bei gleichbleibender Penetrationsrate die Polyspermie senkt. Beim Schwein führt der Kontakt von ovariellen Eizellen mit Oviductin aus der Eileiterflüssigkeit zu einer stark erhöhten Resistenz der ZP gegenüber Proteolyse (Coy et al. 2008a). Coy et al. vermuten, dass die Bindung von Oviductin an die ZP dazu führt, dass sich durch die Glykosylierung des Proteins eine „Hülle“ um die Eizelle bildet, die Bindungsstellen für Proteinasen verdeckt. Gleichzeitig könnten beim Schwein, im

Gegensatz zu der Vermutung von O'Day-Bowman beim Menschen, die Bindungsstellen für Spermien „maskiert“ werden, was zu einer Spermienselektion und damit zu weniger Polyspermie führen würde. Beide Erklärungsansätze gehen davon aus, dass der Einfluss von Oviductin, egal in welche Richtung, vor allem über die spezifische Glykosylierung des Proteins vermittelt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde der HZA dagegen mit rekombinantem, nicht-glykosylierten Oviductin durchgeführt und es stellt sich die Frage, welche Mechanismen in diesem Fall zu einer erhöhten Spermienbindung an die ZP geführt haben. Felines Oviductin besitzt, wie Oviductin anderer Spezies auch, „chitin-binding“ Domänen. Damit könnte das Protein an die ZP binden und eventuell zu einer Veränderung der Oberfläche führen, wodurch die Spermienbindung beeinflusst wird. Eine andere Möglichkeit ist, dass felines Oviductin einen direkten Einfluss auf die Spermien hat. Bei der Durchführung des HZA wurde Oviductin zu der Spermien suspension gegeben, dann wurden die Zonahälften von einem Waschtropfen in einen Tropfen mit Medium umgesetzt und die Spermien mit bzw. ohne Oviductin zugegeben. Die Spermien waren somit für ungefähr eine halbe Stunde dem Protein ausgesetzt, bevor es zum Kontakt mit den Zonahälften kam. Eventuell hat in dieser Zeit eine Interaktion zwischen Oviductin und der Spermienmembran stattgefunden, die die Eigenschaften der Spermien und die Bindung an die ZP beeinflusst haben könnte. Oviductine aller Spezies haben im N-terminalen Bereich zwei potenzielle CRAC-Domänen (cholesterol recognition and/or interaction amino acid consensus domains). Diese CRAC-Domäne findet man auch in dem Protein PDC-109, welches im Seminalplasma von Rindern vorkommt (Scolari et al. 2010). Die Interaktion zwischen PDC-109 und der Spermienmembran bewirkt eine Freisetzung von Cholesterol. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Fluidität der Membran, die unter anderem für die nachfolgende Akrosomenreaktion notwendig ist (Cross 1998). Janjanam et al. fanden heraus, dass Spermien vom Wasserbüffel, die mit rekombinantem nicht-glykosylierten Oviductin inkubiert wurden, nach drei Stunden Inkubation eine höhere Viabilität besaßen als die Kontrollgruppe ohne Oviductin. Gleichzeitig fanden sie in dieser Gruppe nach zwei Stunden Inkubationszeit eine größere Anzahl akrosomenreagerter Spermien (Janjanam et al. 2012). Die gleichen Reaktionen konnten beobachtet werden, wenn Spermien mit Eileiterflüssigkeit, das heißt mit nativem glykosylierten Oviductin, inkubiert wurden (Kumaresan et al. 2005). Diese Veränderungen könnten durch eine Bindung von Oviductin an die Spermienmembran mittels der CRAC-Domäne induziert worden sein.

Zahlreiche Studien beschreiben einen positiven Effekt von Oviductin bzw. Eileiterflüssigkeit auf Befruchtungsraten beim Rind (Martus et al. 1998, King et al. 1994), Teilungs- und Blastozystenraten beim Schwein (Lloyd et al. 2009, McCauley et al. 2003) oder die Embryonalentwicklung bei der Ziege (Pradeep et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit hatte die Zugabe von rekombinantem Oviductin während der IVF bei der Katze dagegen keinen Einfluss auf Teilungs-, Morula- oder Blastozystenraten. Diese Ergebnisse stimmen mit einer aktuellen Studie überein, bei welcher der Effekt der Eileiterflüssigkeit auf IVF, Embryonalentwicklung und

Genexpression der Blastozysten beim Rind untersucht wurde (Cebrian-Serrano et al. 2013). In dieser Studie wurden die Eizellen vor der IVF für 30 Minuten mit Eileiterflüssigkeit inkubiert. Zwar war die Sensitivität der ZP dieser Eizellen gegenüber Pronase signifikant erniedrigt, was für ein „hardening“ der Zona durch Oviductin spricht (Coy et al. 2008b), doch hatte die Bindung von Oviductin an die Eizellen keinen Einfluss auf Befruchtungs-, Teilungs- oder Blastozystenraten. Bei einer anderen Untersuchung am Rind wurden die Eizellen vor der IVF für eine Dauer von zwei Stunden mit Oviductin inkubiert, was zu einer signifikant höheren Befruchtungsrate führte (Martus et al. 1998). Bei unseren Studien wurde Oviductin während der IVF für ungefähr 18 Stunden zu Eizellen und Spermien gegeben. Es ist wahrscheinlich, dass die Gameten in-vivo schon vor der Befruchtung unabhängig voneinander Kontakt zu Oviductin haben und potenzielle Modifikationen stattfinden können. Hier könnte man in zukünftigen Versuchen Katzeizellen und/oder Spermien schon vor der IVF mit Oviductin vorinkubieren oder auch die Zugabe des Proteins bis in die Embryokultur verlängern. Beim Schwein wurden die Zygoten nach der IVF (mit Oviductin) für weitere 48 h in Oviductin-haltigem Medium inkubiert. Dies führte zu erhöhten Teilungs- sowie Blastozystenraten (Kouba et al. 2000). Der gleiche embryotrophe Effekt von Oviductin zeigte sich, wenn Oviductin erst nach der IVF zum Medium gegeben wurde (McCauley et al. 2003). McCauley et al. vermuteten, dass Oviductin einen stimulierenden Effekt auf den Metabolismus der Embryonen haben könnte. Bei allen Überlegungen muss nochmals darauf hingewiesen werden, dass in den vorliegenden funktionellen Experimenten rekombinantes felines Oviductin ohne jegliche Glykosylierung eingesetzt wurde. Auch wenn das rekombinante Protein bei der Katze einen Effekt auf die Bindung zwischen Spermien und ZP hat, könnte es sein, dass nicht-glykosyliertes Oviductin nicht in der Lage ist, seine potenzielle Wirkung auf die Befruchtung und/oder embryonale Entwicklung auszuüben. Um eine mögliche Wirkung von rekombinantem Oviductin auf die Expression von Genen in den Embryonen zu untersuchen, wurden die aus den funktionellen Versuchen entstandenen Blastozysten einzeln untersucht. Mittels RT-qPCR wurde die Genexpression folgender entwicklungsbiologisch relevanter Gene analysiert: Heat shock protein 70 (HSP70), BCL2 associated X protein (BAX), Octamer binding transcription factor 4 (OCT4), DNA methyltransferases 1 and 3A (DNMT1 and DNMT3A), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) und Gap junction protein alpha 1 (GJA1). Blastozysten, die aus einer IVF mit Oviductin entstanden, zeigten, bis auf eine Ausnahme, keine Veränderung in ihrem Expressionsmuster im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Expression von GJA1 war in diesen Blastozysten signifikant höher als in den Blastozysten, die sich aus einer IVF ohne Oviductin entwickelten. GJA1 ist ein Transmembranprotein, welches als Marker für die Qualität von Embryonen dient (Wrenzycki et al. 1996). Bei Rinderembryonen steigt die Expression dieses Gens während der Entwicklung vom 8-16-Zellstadium zur Blastocyste in-vivo stark an, wohingegen sie bei In-vitro-Embryonen auf einem niedrigen Level bleibt (Lonergan et al. 2003). Dies zeigt sich auch in einer Studie von

Lloyd et al., bei welcher unter anderem die Expression von GJA1 bei Rinderblastozysten Grad 1 bzw. Grad 2 (morphologische Einteilung laut IETS – International Embryo Transfer Society-Standard) analysiert wurde (Lloyd et al. 2009). Die „besseren“ Grad 1 Blastozysten zeigten eine signifikant höhere Expression von GJA1 als die Grad 2 Blastozysten. Das Bax-Gen kodiert für ein Protein, das die Einleitung der Apoptose beschleunigt und wird in bovinen In-vivo-Embryonen stärker exprimiert als in In-vitro-Embryonen (Rho et al. 2007). In unseren Untersuchungen hatte die Zugabe von Oviductin während der IVF keinen Einfluss auf die Expression von BAX. Dieses Ergebnis stimmt mit Studien am Rind und am Schwein überein, bei denen die Inkubation ovarieller Eizellen mit Eileiterflüssigkeit vor der IVF ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression von BAX hatte (Cebrian-Serrano et al. 2013, Lloyd et al. 2009). Beim Rind blieb die Expression von DNMT3A, wie auch in unseren Untersuchungen, ebenfalls unverändert (Cebrian-Serrano et al. 2013). Eine Veränderung der mRNA-Level durch die Vorbehandlung der Eizellen mit Eileiterflüssigkeit zeigte sich beim Rind in der Expression des SOD2 Gens (mitochondrial superoxid dismutase 2) und beim Schwein in der Expression des TFAM Gens (mitochondrial transcription factor A). In beiden Fällen war die Expression in den Blastozysten der Behandlungsgruppe signifikant höher als in den Blastozysten der Kontrollgruppe. Bei jeder Zellteilung muss sich auch der Gehalt an Mitochondrien verdoppeln, damit den entstandenen Tochterzellen eine funktionierende Atmungskette und wichtige Stoffwechselfunktionen zur Verfügung stehen. TFAM spielt dabei eine wichtige Rolle in der Initiation der Replikation und Transkription von mitochondrialer DNA (Fisher and Clayton 1985). SOD2 kodiert für ein Protein, das in der Mitochondrienmatrix reaktive Sauerstoffmoleküle neutralisiert und abbaut (Holley et al. 2010). Die Expression dieser beiden Gene in frühen Embryonen könnte ein Indikator für die Aktivität der Mitochondrien sein und damit auch als Qualitätsmarker dienen (Ramalho-Santos et al. 2009, Rizos et al. 2002). Es wäre interessant zu wissen, ob eines dieser Gene auch bei der Katze durch Oviductin beeinflussbar ist und sollte daher in zukünftigen Studien untersucht werden.

Schlussfolgerung und Ausblick

Das Glykoprotein Oviductin wird bei der Hauskatze abhängig vom Zyklus exprimiert und synthetisiert. Vermutlich unter dem Einfluss von Östrogen, findet man während des Östrus bzw. in den Follikelphasen maximale mRNA-Kopien und die Drüsenzellen des Eileiterepithels produzieren zahlreiche sekretorische Vesikel, aus welchen Oviductin in das Lumen des Eileiters abgegeben wird.

Die Expression eines rekombinanten glykosylierten Proteins gestaltete sich schwierig und die Ausbeute ist mit der aktuellen Methode noch sehr gering. Der Einsatz von nativem Oviductin oder gespülter Eileiterflüssigkeit während der IVP zeigt bei mehreren Tierarten eindeutig

positive Effekte auf Befruchtung, Teilungsraten oder frühe Embryonalentwicklung. Dies sollte unbedingt auch bei der Hauskatze noch untersucht werden. Um für zukünftige funktionelle Versuche unabhängig von schwer verfügbarem Probenmaterial zu sein, muss die rekombinante Expression von Oviductin in einer eukaryontischen Zelllinie weiter optimiert werden. Der Einsatz von nicht-glykosyliertem Oviductin im Hemizona Assay zeigte einen Einfluss des Proteins auf die Bindung zwischen Spermien und Zona pellucida, welcher unabhängig von der Glykosylierung ist und damit wahrscheinlich über den N-terminalen Bereich von Oviductin vermittelt wird. Die Methode zu Herstellung des nicht-glykosylierten Oviductins ist etabliert und bietet die Grundlage für weitere Studien hinsichtlich der Funktion(en) der ausgeprägten Glykosylierung von Oviductin.

Der Einsatz von rekombinanten Proteinen in funktionellen Versuchen bietet auch für die In-vitro-Produktion von Embryonen bedrohter Katzenarten die Möglichkeit, positive Effekte von Oviductin zu nutzen. Es ist wahrscheinlich, dass sich die Oviductinsequenzen zwischen den verschiedenen Katzenarten nicht sehr stark unterscheiden, was durch Alignments der Sequenzen überprüft werden kann. Daher sollte es möglich sein, felines rekombinantes Oviductin von der Hauskatze auch in der IVP von wildlebenden Arten einzusetzen. Eine weitere Überlegung in eine ganz andere Richtung wäre der Einsatz von Oviductin-Antikörpern als Maßnahme zur Kontrazeption bei verwilderten Hauskatzen. Allein in Deutschland geht man derzeit von ca. 8 Millionen und weltweit von mehr als einer Milliarde (einschließlich verwilderte Katzen) Tieren aus (Hunter and Barret 2012). Verwilderte Populationen reproduzieren sich in unterschiedlichsten Habitaten sehr gut. Das Unterbinden der Reproduktion durch operative Methoden wie der Kastration aber auch Methoden wie die Umsiedlung von Tieren werden angewendet, um Populationen zu kontrollieren und auch um die Euthanasie von Katzen zu verhindern (Sparkes et al. 2013). Man könnte sich vorstellen, dass die Impfung weiblicher Hauskatzen mit Antikörpern gegen Oviductin zu einer entzündlichen Immunreaktion im Eileiter führt und dadurch das Gewebe dauerhaft oder zum Zeitpunkt des Östrus so geschädigt wäre, dass eine Befruchtung nicht stattfinden kann, beziehungsweise, dass es zu einer dauerhaften Verklebung der Eileiter kommt, die die Passage von Spermien und/oder Embryonen verhindert. Hierbei handelt es sich natürlich erst einmal um rein theoretische Gedanken. Solche Methoden müssen etabliert werden und unterliegen einer strengen ethischen Kontrolle (Levy 2011).

Quellenangaben

- Abe H.; Sendai Y.; Satoh T.; Hoshi H., 1995: Bovine oviduct-specific glycoprotein: a potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in vitro. *Mol Reprod Dev*, 42 226-232.
- Araki Y.; Nohara M.; Yoshida-Komiya H.; Kuramochi T.; Ito M.; Hoshi H.; Shinkai Y.; Sendai Y., 2003: Effect of a null mutation of the oviduct-specific glycoprotein gene on mouse fertilization. *Biochem J*, 374 551-557.
- Arias E. B.; Verhage H. G.; Jaffe R. C., 1994: Complementary deoxyribonucleic acid cloning and molecular characterization of an estrogen-dependent human oviductal glycoprotein. *Biol Reprod*, 51 685-694.
- Aviles M.; Gutierrez-Adan A.; Coy P., 2010: Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod*, 16 896-906.
- Bareither M. L.; Verhage H. G., 1981: Control of the secretory cell cycle in cat oviduct by estradiol and progesterone. *Am J Anat*, 162 107-118.
- Boatman D. E.; Magnoni G. E., 1995: Identification of a sperm penetration factor in the oviduct of the golden hamster. *Biol Reprod*, 52 199-207.
- Boice M. L.; Mavrogianis P. A.; Murphy C. N.; Prather R. S.; Day B. N., 1992: Immunocytochemical analysis of the association of bovine oviduct-specific glycoproteins with early embryos. *J Exp Zool*, 263 225-229.
- Boice M. L.; McCarthy T. J.; Mavrogianis P. A.; Fazlebas A. T.; Verhage H. G., 1990: Localization of oviductal glycoproteins within the zona pellucida and perivitelline space of ovulated ova and early embryos in baboons (*Papio anubis*). *Biol Reprod*, 43 340-346.
- Buhi W. C., 2002: Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction*, 123 355-362.
- Buhi W. C.; Alvarez I. M.; Choi I.; Cleaver B. D.; Simmen F. A., 1996: Molecular cloning and characterization of an estrogen-dependent porcine oviductal secretory glycoprotein. *Biol Reprod*, 55 1305-1314.
- Buhi W. C.; Bazer F. W.; Alvarez I. M.; Mirando M. A., 1991: In vitro synthesis of oviductal proteins associated with estrus and 17 beta-estradiol-treated ovariectomized ewes. *Endocrinology*, 128 3086-3095.
- Buhi W. C.; O'Brien B.; Alvarez I. M.; Erdos G.; Dubois D., 1993: Immunogold localization of porcine oviductal secretory proteins within the zona pellucida, perivitelline space, and plasma membrane of oviductal and uterine oocytes and early embryos. *Biol Reprod*, 48 1274-1283.
- Campbell N.; Reece J., 2003: *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 6. Auflage.

- Carrasco L. C.; Coy P.; Aviles M.; Gadea J.; Romar R., 2008a: Glycosidase determination in bovine oviducal fluid at the follicular and luteal phases of the oestrous cycle. *Reprod Fertil Dev*, *20* 808-817.
- Carrasco L. C.; Romar R.; Aviles M.; Gadea J.; Coy P., 2008b: Determination of glycosidase activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle. *Reproduction*, *136* 833-842.
- Cebrian-Serrano A.; Salvador I.; Garcia-Rosello E.; Pericuesta E.; Perez-Cerezales S.; Gutierrez-Adan A.; Coy P.; Silvestre M. A., 2013: Effect of the bovine oviductal fluid on in vitro fertilization, development and gene expression of in vitro-produced bovine blastocysts. *Reprod Domest Anim*, *48* 331-338.
- Chatdarong K.; Lohachit C.; Linde-Forsberg C., 2004: Distribution of spermatozoa in the female reproductive tract of the domestic cat in relation to ovulation induced by natural mating. *Theriogenology*, *62* 1027-1041.
- Coy P.; Aviles M., 2009: What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *85* (3) 593-605.
- Coy P.; Canovas S.; Mondejar I.; Saavedra M. D.; Romar R.; Grullon L.; Matas C.; Aviles M., 2008a: Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105* 15809-15814.
- Coy P.; Grullon L.; Canovas S.; Romar R.; Matas C.; Aviles M., 2008b: Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction*, *135* 19-27.
- Cross N. L., 1998: Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod*, *59* 7-11.
- DeSouza M. M.; Murray M. K., 1995: An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. *Endocrinology*, *136* 2485-2496.
- Fazleabas A. T.; Verhage H. G., 1986: The detection of oviduct-specific proteins in the baboon (*Papio anubis*). *Biol Reprod*, *35* 455-462.
- Fisher R. P.; Clayton D. A., 1985: A transcription factor required for promoter recognition by human mitochondrial RNA polymerase. Accurate initiation at the heavy- and light-strand promoters dissected and reconstituted in vitro. *J Biol Chem*, *260* 11330-11338.
- Freistedt P.; Stojkovic M.; Wolf E., 2001: Efficient in vitro production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium: effects of season and ovarian status. *Biol Reprod*, *65* 9-13.
- Gandolfi F.; Modina S.; Brevini T. A.; Galli C.; Moor R. M.; Lauria A., 1991: Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona pellucida, perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *Eur J Basic Appl Histochem*, *35* 383-392.

- Georgiou A. S.; Snijders A. P.; Sostaric E.; Aflatoonian R.; Vazquez J. L.; Vazquez J. M.; Roca J.; Martinez E. A.; Wright P. C.; Fazeli A., 2007: Modulation of the oviductal environment by gametes. *J Proteome Res*, 6 4656-4666.
- Gu X.; Wang D., 1997: Improvement of interferon-tau sialylation in chinese hamster ovary cell culture by feeding of N-acetylmannosamine. *Biotechnology and Bioengineering*, 58 642-648.
- Hees H., 1992: Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. Deutscher Ärzteverlag Köln.
- Henrissat B., 1991: A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*, 280 (Pt 2) 309-316.
- Hill J.; Walker S.; Brown G.; Nancarrow C., 1996a: The effects of an ovine oviductal estrus-associated glycoprotein on early embryo development. *Theriogenology*, 46 1367-1377.
- Hill J.; Walker S.; Brown G.; Nancarrow C., 1996b: The effects of an estrus-associated oviductal glycoprotein on the *in vitro* fertilization and development of ovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 46 1379-1388.
- Holley A. K.; Dhar S. K.; St Clair D. K., 2010: Manganese superoxide dismutase vs. p53: regulation of mitochondrial ROS. *Mitochondrion*, 10 649-661.
- Hugentobler S., 2008: Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Molecular Reproduction and Development*, 75(3) 496-503.
- Hunter L.; Barret P., 2012: Raubtiere der Welt. Ein Feldführer. Haupt-Verlag, Wien, 1. Auflage.
- Hunter R., 1998: Have the Fallopian tubes a vital role in promoting fertility? *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 77(5) 475-486.
- Iwata H.; Shiono H.; Kon Y.; Matsubara K.; Kimura K.; Kuwayama T.; Monji Y., 2008: Effects of modification of in vitro fertilization techniques on the sex ratio of the resultant bovine embryos. *Anim Reprod Sci*, 105 234-244.
- Jaffe R. C.; Arias E. B.; O'Day-Bowman M. B.; Donnelly K. M.; Mavrogianis P. A.; Verhage H. G., 1996: Regional distribution and hormonal control of estrogen-dependent oviduct-specific glycoprotein messenger ribonucleic acid in the baboon (*Papio anubis*). *Biol Reprod*, 55 421-426.
- Janjanam J.; Singh S.; Choudhary S.; Pradeep M. A.; Kumar S.; Kumaresan A.; Das S. K.; Kaushik J. K.; Mohanty A. K., 2012: Molecular cloning, sequence characterization and heterologous expression of buffalo (*Bubalus bubalis*) oviduct-specific glycoprotein in *E. coli*. *Mol Biol Rep*, 39 10031-10043.
- Jewgenow K.; Amelkina O.; Painer J.; Goritz F.; Dehnhard M., 2012: Life cycle of feline Corpora lutea: histological and intraluteal hormone analysis. *Reprod Domest Anim*, 47 Suppl 6 25-29.

- Kan F. W.; Esperanzate P. W., 2006: Surface mapping of binding of oviductin to the plasma membrane of golden hamster spermatozoa during in vitro capacitation and acrosome reaction. *Mol Reprod Dev*, 73 756-766.
- Kan F. W.; Roux E.; Bleau G., 1993: Immunolocalization of oviductin in endocytic compartments in the blastomeres of developing embryos in the golden hamster. *Biol Reprod*, 48 77-88.
- Kapur R. P.; Johnson L. V., 1985: An oviductal fluid glycoprotein associated with ovulated mouse ova and early embryos. *Developmental Biology*, 112 89-93.
- Katska L.; Kauffold P.; Smorag Z.; Duschinski U.; Torner H.; Kanitz W., 1989: Influence of hardening of the zona pellucida on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 32 767-777.
- Kimura H.; Matsuda J.; Ogura A.; Asano T.; Naiki M., 1994: Affinity binding of hamster oviductin to spermatozoa and its influence on in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev*, 39 322-327.
- King R. S.; Anderson S. H.; Killian G. J., 1994: Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J Androl*, 15 468-478.
- Kodithuwakku S. P.; Miyamoto A.; Wijayagunawardane M. P., 2007: Spermatozoa stimulate prostaglandin synthesis and secretion in bovine oviductal epithelial cells. *Reproduction*, 133 1087-1094.
- Komiya H.; Onuma T.; Hiroi M.; Araki Y., 1996: In situ localization of messenger ribonucleic acid for an oviduct-specific glycoprotein during various hormonal conditions in the golden hamster. *Biol Reprod*, 55 1107-1118.
- König H. E., 1992: *Anatomie der Katze*. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
- Kouba A. J.; Abeydeera L. R.; Alvarez I. M.; Day B. N.; Buhi W. C., 2000: Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy, and embryonic development in vitro. *Biol Reprod*, 63 242-250.
- Kumaresan A.; Ansari M. R.; Garg A., 2005: Modulation of post-thaw sperm functions with oviductal proteins in buffaloes. *Anim Reprod Sci*, 90 73-84.
- Kuranda M. J.; Robbins P. W., 1991: Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 266 19758-19767.
- Leese H. J.; Hugentobler S. A.; Gray S. M.; Morris D. G.; Sturmey R. G.; Whitear S. L.; Sreenan J. M., 2008: Female reproductive tract fluids: composition, mechanism of formation and potential role in the developmental origins of health and disease. *Reprod Fertil Dev*, 20 1-8.
- Lengwinat T.; C. P.; S. B., 1993: Befruchtungs- und Entwicklungskompetenz nonovulatorischer Katzenoocyten nach Kokultivierung mit epididymalen Spermien und feline Oviduktepithelzellen. *Reproduction of Domestic Animals*, 28 236-243.
- Leveille M. C.; Roberts K. D.; Chevalier S.; Chapdelaine A.; Bleau G., 1987: Uptake of an oviductal antigen by the hamster zona pellucida. *Biol Reprod*, 36 227-238.

- Levy J. K., 2011: Contraceptive vaccines for the humane control of community cat populations. *Am J Reprod Immunol*, **66** 63-70.
- Li R.; Whitworth K.; Lai L.; Wax D.; Spate L.; Murphy C. N.; Rieke A.; Isom C.; Hao Y.; Zhong Z.; Katayama M.; Schatten H.; Prather R. S., 2007: Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos. *Mol Reprod Dev*, **74** 1228-1235.
- Lloyd R. E.; Romar R.; Matas C.; Gutierrez-Adan A.; Holt W. V.; Coy P., 2009: Effects of oviductal fluid on the development, quality, and gene expression of porcine blastocysts produced in vitro. *Reproduction*, **137** 679-687.
- Lok I. H.; Briton-Jones C. M.; Yuen P. M.; Haines C. J., 2002: Variable expression of oviductin mRNA at different stages of human reproductive cycle. *J Assist Reprod Genet*, **19** 569-576.
- Lonergan P.; Rizos D.; Gutierrez-Adan A.; Moreira P. M.; Pintado B.; de la Fuente J.; Boland M. P., 2003: Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biol Reprod*, **69** 1424-1431.
- Malette B.; Bleau G., 1993: Biochemical characterization of hamster oviductin as a sulphated zona pellucida-binding glycoprotein. *Biochem J*, **295** (Pt 2) 437-445.
- Malette B.; Paquette Y.; Bleau G., 1995a: Size variations in the mucin-type domain of hamster oviductin: identification of the polypeptide precursors and characterization of their biosynthetic maturation. *Biol Reprod*, **53** 1311-1323.
- Malette B.; Paquette Y.; Merlen Y.; Bleau G., 1995b: Oviductins possess chitinase- and mucin-like domains: a lead in the search for the biological function of these oviduct-specific ZP-associating glycoproteins. *Mol Reprod Dev*, **41** 384-397.
- Martus N. S.; Verhage H. G.; Mavrogianis P. A.; Thibodeaux J. K., 1998: Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal specific glycoprotein. *J Reprod Fertil*, **113** 323-329.
- McBride D. S.; Boisvert C.; Bleau G.; Kan F. W., 2004: Evidence for the regulation of glycosylation of golden hamster (*Mesocricetus auratus*) oviductin during the estrous cycle. *Biol Reprod*, **70** 198-203.
- McBride D. S.; Brockhausen I.; Kan F. W., 2005: Detection of glycosyltransferases in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) oviduct and evidence for the regulation of O-glycan biosynthesis during the estrous cycle. *Biochim Biophys Acta*, **1721** 107-115.
- McCauley T. C.; Buhi W. C.; Wu G. M.; Mao J.; Caamano J. N.; Didion B. A.; Day B. N., 2003: Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biol Reprod*, **69** 828-834.

- Merchan M.; Peiro R.; Santacreu M. A.; Francino O.; Folch J. M., 2007: Rabbit oviductal glycoprotein 1 gene: genomic organization polymorphism analysis and mRNA expression. *Mol Reprod Dev*, **74** 687-693.
- Mogas T.; Palomo M. J.; Izquierdo M. D.; Paramio M. T., 1997: Morphological events during in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, **48** 815-829.
- Mondejar I.; Acuna O. S.; Izquierdo-Rico M. J.; Coy P.; Aviles M., 2012: The oviduct: functional genomic and proteomic approach. *Reprod Domest Anim*, **47 Suppl 3** 22-29.
- Morrison C. J.; Easton R. L.; Morris H. R.; McMaster W. R.; Piret J. M.; Dell A., 2000: Modification of a recombinant GPI-anchored metalloproteinase for secretion alters the protein glycosylation. *Biotechnol Bioeng*, **68** 407-421.
- Mugnier S.; Kervella M.; Douet C.; Canepa S.; Pascal G.; Deleuze S.; Duchamp G.; Monget P.; Goudet G., 2009: The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine in vitro fertilization rate: are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved? *Reprod Biol Endocrinol*, **7** 129.
- Natraj U.; Bhatt P.; Vanage G.; Moodbidri S. B., 2002: Overexpression of monkey oviductal protein: purification and characterization of recombinant protein and its antibodies. *Biol Reprod*, **67** 1897-1906.
- O'Day-Bowman M.; Mavrogianis P.; Reuter L.; Johnson D.; Fazleabas A.; Verhage H., 1996: Association of Oviduct-Specific Glykoproteins with Human and Baboon (*Papio anubis*) Ovarian Oocytes and Enhancement of Human Sperm Binding to Human Hemizonae Following In Vitro Incubation. *Biology of Reproduction*, **54** 60-69.
- O'Day-Bowman M. B.; Mavrogianis P. A.; Fazleabas A. T.; Verhage H. G., 1995: A human oviduct-specific glycoprotein: synthesis, secretion, and localization during the menstrual cycle. *Microscopy Research and Technique*, **32** 57-69.
- Paquette Y.; Merlen Y.; Malette B.; Bleau G., 1995: Allelic polymorphism in the hamster oviductin gene is due to a variable number of mucin-like tandem repeats. *Mol Reprod Dev*, **42** 388-396.
- Parekh R. B.; Patel T. P., 1992: Comparing the glycosylation patterns of recombinant glycoproteins. *Trends Biotechnol*, **10** 276-280.
- Paulson J. C.; Weinstein J.; Schauer A., 1989: Tissue-specific expression of sialyltransferases. *J Biol Chem*, **264** 10931-10934.
- Pelican K. M.; Brown J. L.; Wildt D. E.; Ottinger M. A.; Howard J. G., 2005: Short term suppression of follicular recruitment and spontaneous ovulation in the cat using levonorgestrel versus a GnRH antagonist. *Gen Comp Endocrinol*, **144** 110-121.
- Pradeep M. A.; Jagadeesh J.; De A. K.; Kaushik J. K.; Malakar D.; Kumar S.; Dang A. K.; Das S. K.; Mohanty A. K., 2011: Purification, sequence characterization and effect of goat

- oviduct-specific glycoprotein on in vitro embryo development. *Theriogenology*, 75 1005-1015.
- Punyadeera C.; Dassen H.; Klomp J.; Dunselman G.; Kamps R.; Dijcks F.; Ederveen A.; de Goeij A.; Groothuis P., 2005: Oestrogen-modulated gene expression in the human endometrium. *Cell Mol Life Sci*, 62 239-250.
- Ramalho-Santos J.; Varum S.; Amaral S.; Mota P. C.; Sousa A. P.; Amaral A., 2009: Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update*, 15 553-572.
- Reuter L. M.; O'Day-Bowman M. B.; Mavrogianis P. A.; Fazleabas A. T.; Verhage H. G., 1994: In vitro incubation of golden (Syrian) hamster ovarian oocytes and human sperm with a human oviduct specific glycoprotein. *Mol Reprod Dev*, 38 160-169.
- Rho G. J.; S B.; Kim D. S.; Son W. J.; Cho S. R.; Kim J. G.; B M. K.; Choe S. Y., 2007: Influence of in vitro oxygen concentrations on preimplantation embryo development, gene expression and production of Hanwoo calves following embryo transfer. *Mol Reprod Dev*, 74 486-496.
- Rizos D.; Lonergan P.; Boland M. P.; Arroyo-Garcia R.; Pintado B.; de la Fuente J.; Gutierrez-Adan A., 2002: Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol Reprod*, 66 589-595.
- Rizos D.; Ramirez M. A.; Pintado B.; Lonergan P.; Gutierrez-Adan A., 2010: Culture of bovine embryos in intermediate host oviducts with emphasis on the isolated mouse oviduct. *Theriogenology*, 73 777-785.
- Robitaille G.; St-Jacques S.; Potier M.; Bleau G., 1988: Characterization of an oviductal glycoprotein associated with the ovulated hamster oocyte. *Biol Reprod*, 38 687-694.
- Satoh T.; Abe H.; Sendai Y.; Iwata H.; Hoshi H., 1995: Biochemical characterization of a bovine oviduct-specific sialo-glycoprotein that sustains sperm viability in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 1266 117-123.
- Scolari S.; Muller K.; Bittman R.; Herrmann A.; Muller P., 2010: Interaction of mammalian seminal plasma protein PDC-109 with cholesterol: implications for a putative CRAC domain. *Biochemistry*, 49 9027-9031.
- Sendai Y.; Abe H.; Kikuchi M.; Satoh T.; Hoshi H., 1994: Purification and molecular cloning of bovine oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod*, 50 927-934.
- Sendai Y.; Komiya H.; Suzuki K.; Onuma T.; Kikuchi M.; Hoshi H.; Araki Y., 1995: Molecular cloning and characterization of a mouse oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod*, 53 285-294.
- Sinowatz F.; Kolle S.; Topfer-Petersen E., 2001: Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs*, 168 24-35.

- Slavik T.; Libik M.; Wierzchos E.; Fulka J., 2005: An attempt to reduce polyspermic penetration in lamb oocytes. *Folia Biol (Praha)*, 51 34-39.
- Sparkes A. H.; Bessant C.; Cope K.; Ellis S. L.; Finka L.; Halls V.; Hiestand K.; Horsford K.; Laurence C.; MacFarlane I.; Neville P. F.; Stavisky J.; Yeates J., 2013: ISFM guidelines on population management and welfare of unowned domestic cats (*Felis catus*). *J Feline Med Surg*, 15 811-817.
- Strous G. J.; Dekker J., 1992: Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 27 57-92.
- Suzuki K.; Sendai Y.; Onuma T.; Hoshi H.; Hiroi M.; Araki Y., 1995: Molecular characterization of a hamster oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod*, 53 345-354.
- Tian X.; Pascal G.; Fouchecourt S.; Pontarotti P.; Monget P., 2009: Gene birth, death, and divergence: the different scenarios of reproduction-related gene evolution. *Biol Reprod*, 80 616-621.
- Verhage H. G.; Fazleabas A. T., 1988: The in vitro synthesis of estrogen-dependent proteins by the baboon (*Papio anubis*) oviduct. *Endocrinology*, 123 552-558.
- Verhage H. G.; Fazleabas A. T.; Donnelly K., 1988: The in vitro synthesis and release of proteins by the human oviduct. *Endocrinology*, 122 1639-1645.
- Verhage H. G.; Fazleabas A. T.; Mavrogianis P. A.; O'Day-Bowman M. B.; Donnelly K. M.; Arias E. B.; Jaffe R. C., 1997: The baboon oviduct: characteristics of an oestradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Hum Reprod Update*, 3 541-552.
- Verhage H. G.; Mavrogianis P. A.; O'Day-Bowman M. B.; Schmidt A.; Arias E. B.; Donnelly K. M.; Boomsma R. A.; Thibodeaux J. K.; Fazleabas A. T.; Jaffe R. C., 1998: Characteristics of an oviductal glycoprotein and its potential role in the fertilization process. *Biol Reprod*, 58 1098-1101.
- Vieira E. G.; Chapman D. A.; Killian G. J., 1999: Evidence for multiple forms of estrus-associated protein in bovine oviductal fluid associated with oviduct region and stage of the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 60 202.
- Wang W. H.; Abeydeera L. R.; Prather R. S.; Day B. N., 1998: Morphologic comparison of ovulated and in vitro-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev*, 49 308-316.
- Wegner C.; Kilian GJ, 1991: In Vitro and In Vivo Association of an Oviduct Estrus-Associated Protein With Bovine Zona Pellucida. *Molecular Reproduction and Development*, 29 77-84.
- Wildt D. E.; Chan S. Y.; Seager S. W.; Chakraborty P. K., 1981: Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biol Reprod*, 25 15-28.
- Wrenzycki C.; Herrmann D.; Carnwath J. W.; Niemann H., 1996: Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *J Reprod Fertil*, 108 17-24.

- Xu J. S.; Chan S. T.; Lee W. W.; Lee K. F.; Yeung W. S., 2004: Differential growth, cell proliferation, and apoptosis of mouse embryo in various culture media and in coculture. *Mol Reprod Dev*, *68* 72-80.
- Yang C. H.; Yanagimachi R., 1989: Differences between mature ovarian and oviductal oocytes: a study using the golden hamster. *Hum Reprod*, *4* 63-71.
- Yang M.; Butler M., 2000: Effect of ammonia on the glycosylation of human recombinant erythropoietin in culture. *Biotechnol Prog*, *16* 751-759.
- Yang X.; Tao S.; Orlando R.; Brockhausen I.; Kan F. W., 2012: Structures and biosynthesis of the N- and O-glycans of recombinant human oviduct-specific glycoprotein expressed in human embryonic kidney cells. *Carbohydr Res*, *358* 47-55.
- Yong P.; Gu Z.; Luo J. P.; Wang J. R.; Tso J. K., 2002: Antibodies against the C-terminal peptide of rabbit oviductin inhibit mouse early embryo development to pass 2-cell stage. *Cell Res*, *12* 69-78.

Anhang

Artikel 1

Sequence analysis of feline Oviductin and its expression during the estrous cycle in the domestic cat (*Felis catus*)



Sequence analysis of feline oviductin and its expression during the estrous cycle in the domestic cat (*Felis catus*)

A. Hachen*, K. Jewgenow, B.C. Braun

Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlin, Germany

Received 6 May 2011; received in revised form 16 August 2011; accepted 16 August 2011

Abstract

Oviductins belong to a family of oviduct-specific glycoproteins believed to play an important role in fertilization and/or early embryonic development. Oviductin cDNA between species is highly conserved and shares 58% to 98% similarity in the deduced amino acid sequences. Our objective in this study was to sequence the full open reading frame of the feline oviductin and to examine its expression during the estrous cycle on both mRNA and protein level. The obtained cDNA containing the full open reading frame was determined to be 1677 nucleotides coding for a deduced protein of 558 amino acids. Identities between species range from 74% (mouse) to 80% (human, baboon, and rhesus) within the N-terminal protein region. Major differences were localized in the carboxy terminal region, which corresponds to exon 11 of the gene. Feline oviductin contained one putative *N*-linked glycosylation site, six *O*-linked glycosylation sites, a potential heparin binding site, and two cholesterol recognition and/or interaction amino acid consensus (CRAC) domains. Oviductin expression was analyzed by real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and immunohistochemistry. Both approaches revealed an estrous cycle-dependent expression in the ampulla and isthmus. Quantitative PCR showed highest oviductin mRNA copy numbers in the early and late follicular stage and reduced mRNA expression during all other stages. With the exception of the early follicular stage, feline oviductin mRNA abundance was not significantly different in the oviductal segments ampulla and isthmus. A prominent immunolabeling was seen in the early and late follicular stage which disappeared after ovulation, indicating a function of the protein during sperm storage and fertilization.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Oviductin; Oviduct; Estrogen-dependent expression

1. Introduction

Within the female reproductive tract the oviduct shows a high secretory activity, providing an optimal milieu for final maturation of gametes, capacitation of spermatozoa, transport of gametes and embryos, fertilization, and early embryonic development. During the estrous cycle the mammalian oviduct undergoes signif-

icant morphological, biochemical, and physiological changes. Around the time of ovulation these changes establish an essential environment for fertilization. The main secretory product at this time is an oviduct-specific, estrogen-dependent glycoprotein, also named oviductin, which was identified in human [1], baboon [2], cow [3], pig [4], sheep [5], hamster [6], mouse [7], rhesus monkey [8], rabbit [9], and recently in goat [10]. Oviductin is synthesized and released exclusively by secretory, nonciliated oviductal epithelium. Regulation of oviductin mRNA expression appears to be different between species with a long estrous cycle and those

* Corresponding author. Tel.: +49 30 5168 617; fax: +49 30 5126 104.

E-mail address: hachen@izw-berlin.de (A. Hachen).

with a relatively short cycle (rodents). In most species examined expression of oviductin mRNA shows correlation with circulating concentrations of serum estrogen. Oviductin mRNA increases to a maximum value during the late follicular phase in women [1] and on Day 0–2 of estrous in pigs [4], whereas during the luteal phase or diestrous oviductin mRNA is nearly undetectable. In contrast, hamster oviductin mRNA expression does not change significantly throughout the estrous [11]. Oviductin has been demonstrated to be the major secretory product in the oviduct before the time of ovulation and several functional studies indicate a potential biological role of oviductin during fertilization and early embryonic development [12]. A universal characteristic of oviductin is its association with the zona pellucida of ovulated oocytes; this has been observed in most mammals examined including hamster [13], pig [14], cow [15], sheep [16], and baboon [17]. Coincubation of oocytes and/or spermatozoa with purified porcine oviductin before IVF maximized efficiency of fertilization and reduced the incidence of polyspermy even though penetration rate did not differ. Moreover, porcine embryos matured and fertilized *in vitro* showed significant increase in cleaving and blastocyst formation when exposed to oviductin suggesting embryotrophic effects of oviductin [18]. Similarly, bovine oocytes preincubated with oviductin demonstrated significant increases in fertilization rates [19]. Treatment of bovine spermatozoa with semipurified oviductin increased capacitation and ability to fertilize bovine oocytes [20] and increased motility and viability [21]. In summary, it seems that this oviduct-specific glycoprotein oviductin has direct effects on spermatozoa, egg penetration, fertilization, and early embryonic development. However, specific mechanism(s) behind these effects are still not elucidated.

In the domestic cat, which is an induced ovulator, high estrogen levels lead to a maximal receptivity of the female [22] and induce hypertrophy and differentiation of the oviductal epithelium including the development of apical secretory granules in nonciliated cells [23]. Repeated mating and multiple ejaculatory series elicit a luteinizing hormone (LH) response after ovulation during the first two days of estrous, which is six days on average [24]. Approximately three days after mating, circulating progesterone levels begin to increase and result in cell atrophy and dedifferentiation of oviductal epithelium within the same day [23].

The domestic cat serves as a model species for wild felids which are all listed on the International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List of threatened

species (<http://www.IUCN.org>). Assisted reproduction techniques (ART), such as artificial insemination and IVF, are becoming increasingly significant with respect to managing and maintaining endangered populations of felid species. Successful assisted reproduction requires knowledge about events taking place in the female reproductive tract during ovulation, fertilization, and embryo development. Our aim is to characterize the feline oviductin in order to improve IVF in the domestic cat. Supplementing native or recombinant purified feline oviductin to IVF systems might support the development of *in vitro* embryos of wild felids when the role of oviductin is elucidated in the domestic cat. Therefore, the objective of this study was to obtain the full open reading frame and protein sequence of feline oviductin and to examine its expression during the estrous cycle on mRNA and protein level as a prerequisite for analyzing the functional role of oviductin in IVF experiments.

2. Materials and methods

2.1. Tissue collection

Oviducts and ovaries from domestic cats were obtained from the animal shelter Berlin and other local animal clinics after ovariohysterectomy. The tissue was transferred immediately after excision in transport media (25 mM HEPES, 3% BSA, 1% antibiotic antimycotic solution; Sigma-Aldrich, Munich, Germany), stored at 4°C and carried to the laboratory. Most samples were obtained from free-ranging domestic cats of unknown age and fertility. Therefore, oviducts were classified according to the ovarian morphology as inactive (no follicles visible), early follicular (follicles 1–2 mm), late follicular (follicles > 2 mm), freshly ovulated (one or more corpora hemorrhagica visible), or luteal (one or more corpora lutea visible) according to Freistedt, et al. [25] with minor modifications. This classification can be related to the estrous cycle stages; anestrus (inactive), proestrus (early follicular), estrus (late follicular), and diestrus (luteal) in the cat. Existence of corpora hemorrhagica or corpora lutea on the ovary surface was judged as a sign of proceeded ovulation. Information about pregnancy or pseudopregnancy duration (time period between ovulation and ovariohysterectomy) was not available. Oviductal segments - the ampulla (A) and isthmus (I) - were separated by dissection and stored at –80 °C for subsequent RNA isolation. For sequence analysis oviducts were stored as a whole at –80 °C. For immunohistochem-

Table 1

Sequences of polymerase chain reaction primers used for sequence analysis (a) and expression studies (b), position in coding sequence, annealing temperature, amplicon length, and amplified fragments.

Primer	Primer sequence 5'–3'	Position	T _A (°C)	Length (bp)	Use	Fragment
Oviductin (Ovn)	Fw 1: CTG GAC CCC TTT CTC TGC AC	154–1012	58	858	a	1
	Rv 1: CAT AGC CAA CCC ACT CCT TCC					
	Fw 2: CAC TTG AGC CCT AGC CTT GT	–38 to 256	55	294	a	2
	Rv 2: CTG GGT AGA TA ATTT TCT CAT C					
	Fw 3: CTG ACC CTG AAA GTC CGA C	1235–1769	55	534	a	3
	Rv 3: CGA ACT GAC AGA GGA CTC G					
	Fw 4: CAA GCA AGA TGG CTT CTT GG	891–1399	55	508	a	4
	rv4: CAG TGT GCT TTC CAA AGG AC					
	Fw 5: CAC TTG AGC CCT AGC CTT GT	–38 to 1769	54	1731	a	fOvn-Co
	Rv 5: CGA ACT GAC AGA GGA CTC G					
β -actin	Fw 6: CTG ACC CTG AAA GTC CGA C	1235–1399	60	164	b	
	Rv 6: CAG TGT GCT TTC CAA AGG AC					
B2MG	Fw: ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA	186–355	60	169	b	
	Rv: CTC CAG GGA GGA CGA GGA C					
GAPDH	Fw: GGG TTC CAC CCA CCA CAA A	145–335	61	190	b	
	Rv: ACG ACC TTG GGC TCA CTG AG					
GAPDH	Fw: AAG GGT GGG GCC AAG AGG	332–456	61	124	b	
	Rv: AGA GGG GCC AGG CAG TTG					

B2MG, β -2-microglobulin; bp, base pair; fOvn-Co, feline oviductin consensus sequence; Fw, forward; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Rv, reverse.

istry, tissue from the two segments was fixed in Bouins solution following the procedure described in 2.6.

2.2. Sequence analysis

Total RNA for sequence analysis was isolated from four complete oviducts with the RNeasy Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA was finally eluted in 200 μ L RNase-free water and its concentration and purity was assessed with the NanoDrop 1000 (PepLab, Erlangen, Germany). Total RNA was stored at -80°C . Reverse transcription (4.7 μ g of total RNA) was performed in a 40- μ L reaction volume using 400 U SuperScript II reverse transcriptase, 1 μ g Oligo-dT₁₈ primers, and 0.5 mM of each dNTPs (Invitrogen, Darmstadt, Germany) following the manufacturer's protocol. Mix was incubated at 42°C for 55 min and reaction was inactivated by heating at 70°C for 15 min. First forward and reverse primers (Ovn-fw1/rv1) for polymerase chain reaction (PCR) amplification were designed from highly conserved regions after alignment of sequences from porcine (NM_214070), bovine (NM_001080216), canine (XM_847145), and human (NM_002557) oviductin. This first 858 base pair (bp) amplicon (fragment 1) was compared with the cat shotgun sequence (*Felis catus* c408601094.contig1b10, whole genome shotgun sequence) using the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, software ver-

sion 2.2.4) program. Identical areas were found in a shotgun fragment (ACBE01538076.1) and new primers for the 1.5' end (fragment 2) were designed (Ovn-fw2/rv2). After a BLAST search with porcine and canine oviductin sequences, another feline shotgun fragment (ACBE01454238.1) for a potential 3' end was identified and Ovn-fw3/rv3 primers were designed (fragment 3). Another primer pair (fw4/rv4) designed after sequence alignment was used for a last fragment amplification in the middle of the sequence (fragment 4). Necessary primer information and localization of the four fragments are listed in Table 1. All primers were purchased from BioTez (Berlin, Germany). For PCR reaction 1 μ L of cDNA were amplified with 2 U Expand High Fidelity^{Plus} polymerase (Roche, Mannheim, Germany) in a final volume of 50 μ L containing 1 \times reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTPs, and 0.5 μ M of each specific primer in the final concentration. PCR was performed in the G-Storm GS1 thermal cycler (Gene Technologies, Essex, UK). The thermal cycling profile was 95°C for 6 min, 30 cycles of denaturation at 95°C for 45 sec, annealing at 54°C (55°C , 58°C) for 45 sec and extension at 72°C for 45 sec (90 sec) followed by final extension at 72°C for 7 min. Nontemplate controls were included. PCR products were separated on a 1.2% agarose gel containing 3 μ L/100 mL GelRed nucleic acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA, USA), purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Health-

care, Munich, Germany) and then sequenced by the “Services in Molecular Biology” (Dr. M. Meixner, Humboldt University, Berlin, Germany). The sequenced fragments (fragments 1–4) were put together to one feline oviductin consensus sequence (fOvn-Co). Finally a complete fOvn-Co product was amplified with primers Ovnfw5/rv5 (Table 1), ligated with the pGEM-T Easy Vector (Promega, Mannheim, Germany), transformed in *E. coli* strain JM109 (Promega) and sequenced to confirm the consensus sequence.

2.3. Expression studies

For expression studies 20 mg oviductal tissue from six animals per stage (ampulla and isthmus region) were placed in tubes with 100 μ L of RNA Lysis buffer T-P with 1.4/2.8-mm ceramic beads. Tissue was disrupted in the Precellys 24 Homogenizer (Pqclab) (2×15 sec at 6500 rpm) and total RNA was extracted following the Precellys Tissue RNA protocol. RNA was eluted in 50 μ L RNase-free water and its concentration and purity was assessed with the NanoDrop 1000 (Pqclab). Because primers for real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) were not intron-spanning, 1 μ g total RNA was digested with 1 U RNase-free DNase I (Fermentas, Sankt Leon-Rot, Germany) to avoid genomic DNA contamination before reverse transcription. In addition, RT-qPCR runs with minus-RT samples were performed. RNA was reverse transcribed with 100 μ M Oligo-dT₁₈ primers using the RevertAid first Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) according to the manufacturer’s protocol. For quantitative oviductin cDNA amplification primers Ovn-fw6 and Ovn-rv6 were used to obtain a 180 bp fragment. For normalization, fragments of the reference genes β -actin (AB051104), β -2-microglobulin (B2MG, NM_001009876) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, NM_001009307) were amplified. Further primer information is listed in Table 1. For the RT-qPCR reaction cDNA was diluted 1:40 with H₂O and 4 μ L of diluted cDNA samples each equivalent to 5 ng of total RNA were analyzed in a 10- μ L reaction volume with the CFX 96 thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) and 100 nM of reverse and forward primer each. All RT-qPCR reactions were run in duplicates with a nontemplate control to check for contaminations. RT-qPCR conditions were 3 min at 95 °C and 40 cycles of each 95 °C for 10 sec, 60 °C (61 °C) for 20 sec, and 72 °C for 15 sec. Melting curve analysis was performed from 65 °C to 95 °C in 0.5 °C steps each lasting 5 sec to

confirm presence of a single product and absence of primer-dimers. The threshold was determined automatically by the CFX Manager Software 1.6 (Bio-Rad Laboratories).

2.4. Quantification

Quantitative analysis of RT-qPCR products was carried out in the CFX 96 thermocycler (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using external recombinant plasmid DNA standard dilutions derived from cloned cDNA of oviductin and cloned cDNA fragments of the reference genes β -actin, B2MG, and GAPDH. Calibration points from 10^7 molecules down to 10 molecules per reaction were used as calibration curve for RT-qPCR. For normalization, reference genes were validated in the geNorm program [26] and a normalization factor (NF) was calculated for all estrous cycle stages. For normalization, oviductin real time PCR quantities from every cycle stage were divided by the corresponding normalization factor.

2.5. Statistical analysis

All statistical methods were performed with the normalized RT-qPCR quantities. Due to big differences among the standard deviations within the five groups data were transformed (log). For comparison of oviductin mRNA expression in the ampulla and isthmus region Wilcoxon signed-rank test was performed. One-way ANOVA and Tukey-Kramer multiple comparison post-hoc test were used to analyze differences in mRNA quantities across the estrous stages. Statistical values of $P < 0.05$ were considered significant.

2.6. Preparation of tissues for immunohistochemistry and detection of feline oviductin

For immunohistochemical studies, the ampulla and isthmus region of the oviducts were dissected and fixed in Bouins solution for 24 h, followed by paraffin embedding. Sections of 3- μ m thickness were prepared and placed on microscope slides (Superfrost Plus, Thermo Scientific, Braunschweig, Germany). Sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in decreasing concentrations of ethanol before rinsing in PBS (pH 7.2). The antigenic sites were enhanced by incubation of sections in boiling citrate buffer (11 mM, pH 6.0) for 15 min. Next, endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the sections for 10 min in 3% H₂O₂ in methanol, followed by blocking with 5% BSA in PBS for 1 h at 37 °C to reduce nonspecific binding of the first antibody. Sections were then incubated overnight with polyclonal goat anti-human oviductin anti-

body (sc-46432; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; dilution 1:50 in PBS containing 1% BSA) at 4 °C. After labeling with primary antibody, sections were washed with PBS-Tween 0.1% and incubated with horseradish peroxidase conjugated mouse anti-goat IgG (sc-2354; Santa Cruz Biotechnology; dilution 1:50 in PBS containing 1% BSA) for 1 h at room temperature. The immunoperoxidase color reaction was developed with diaminobenzidine (DAB) substrate chromogen solution (Dako, Glostrup, Denmark). The sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated in increasing concentrations of ethanol, and covered with mounting medium and coverslips. To assess the specificity of the immunolabeling, control experiments were performed by incubating the sections with BSA instead of with primary antibody or with the primary antibody pretreated with goat anti-human oviductin blocking peptide (sc-46432 P; Santa Cruz Biotechnology). All other steps and conditions remained the same.

3. Results

3.1. Full-length cDNA sequence

The analyzed cDNA sequence of feline oviductin comprises 1750 bp (Fig. 1) containing an open reading frame of 1677 bp coding for a 558-amino acid protein with a calculated molecular mass of 62 kDa and a pI of 9.35 as indicated by the Compute pI/Mw tool (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Switzerland). The deduced protein displayed a 21-amino acid signal peptide and contained one potential *N*-linked glycosylation site at position 517–519 (NIT) and six potential mucin type GalNAc *O*-linked glycosylation sites at position 390, 516, 518, 523, 525, and 545 (Proteomic Tool NetNGlyc 1.0, NetOGlyc 2.0, Swiss Institute of Bioinformatics). A cluster of six amino acids (PMRDRW) at position 152 to 157 shows similarity to a heparin-binding sequence. In addition, two cholesterol recognition and/or interaction amino acid consensus (CRAC) domains were located at Position 138–146 (LFFLYPGVR) and 319–325 (VPYAYK). Feline oviductin cDNA sequence has been deposited in the GenBank with accession number GU306151. A GenBank database search using BLAST and ClustalW alignments revealed that feline oviductin shows identity in both nucleotide and amino acid sequence to all oviductin sequences that have so far been determined. Feline nucleotide sequence showed identity to sequences from cow (NM_001080216, 75%), mouse and rabbit (NM_007696, NM_001082105, 77%), hamster (D32218, 78%), pig

(NM_214070, 79%), dog, sheep, and goat (XM_847145, NM_001009779, DQ482670, 80%), human, baboon, and rhesus (NM_002557, NM_001112617, NM_001042787, 82%). Within the deduced polypeptide, the most significant consistence to the feline protein was found within the N-terminal region (amino acid 1–385) with identities from 74% (mouse) to 80% (human, baboon, rhesus). In contrast, major differences were seen in the carboxy terminal region (amino acid 386–558) where identities range from 24% (mouse) to 48% (canine XM_847145).

Alignment of fOvn-Co1 with the cat whole genome shotgun sequence revealed that the feline oviductin gene is composed of 11 exons and 10 introns. All the introns followed the GT/AG rule for splice site identification.

3.2. Expression of feline oviductin mRNA during the estrous cycle

Real time quantitative PCR demonstrated that feline oviductin mRNA levels were significantly greater in the early and late follicular stage than in all other stages (Fig. 2; $P < 0.05$). Oviductin mRNA expression increased by almost 100-fold in the early and late follicular stage compared with the inactive stage and then decreased in the freshly ovulated stage and showed lowest mRNA levels in the luteal stage. Highest mRNA abundance was found in the late follicular stage; mRNA copy numbers differed significantly from those in the inactive, freshly ovulated, and luteal stage ($P < 0.001$). Analysis of feline oviductin mRNA expression levels in the different functional segments ampulla and isthmus showed no significant differences, with the exception of the early follicular stage ($P = 0.046$).

3.3. Distribution of feline oviductin protein during the estrous cycle

Strongest signals in immunohistochemistry, characterized by brown staining, were observed in the early and late follicular stage (Fig. 3C–F), whereas no oviductin was detectable in the inactive (Fig. 3A and B), freshly ovulated (Fig. 3G and H), and luteal stage (Fig. 3I and J). Immunoreaction was restricted to the non-ciliated secretory epithelium and was mainly located in the apical portion of the cells. There were no differences seen in the staining pattern between ampulla and isthmus. Immunoreaction was absent in sections treated with anti-human oviductin blocking peptide (Fig. 3L) and BSA (not shown), respectively. During the estrous cycle the oviductal epithelium underwent significant morphologic changes. In the early and late follicular

```

AGCTCTCAGACCTTTGAGATGGGGAGGCTGTTGCTGTGGGTTGGCTGGTTCTTGTGCTG 14
R H H D G A A H K L V C Y F A G W A Q S 60
AGGCACCATGACGSCGCCGCCACAACTGGTGTGTTATTTTCCGGCTGGGCGCAGAGT 120
R P G P A S I L P R D L D P F L C T H L 54
CGACCTGGCCCTGCCTCGATCTTGCCCGTGACCTGGACCCCTTCTCTGTACCCACCTG 180
I F A F A S M N N N H I V A K D F R D E 74
ATATTTGCTTCGCCTCAATGAACAACAATCACATCGTTGCTAAGGATTTCGGGGATGAG 240
K I I Y P E F N K L K E K N R K L K T L 94
AAAATTATCTACCCAGAGTTCAACAAGCTCAAGGAGAAACAGGAGCTGAAACACTG 300
L S I G G W N F G T T R F T T M L S T S 114
CTGTCCATTGGCGGGTGAACCTTTGGCACAACAGCTTCACCACCATGCTTTCCACATCG 360
A N R E R F I D S V I S L L R T H N F D 134
GCCAACCGGAAAGGTTTATTGATTCAGTTATATCCCTCCTGAGGACACATAACTTTGAT 420
G L D L F F L Y P G V R G S P M R D R W 154
GGTCTGGACCTCTTCTTCTGATCTCTGGAGTAAGAGGCGAGTCCCATGAGGGACCGATGG 480
T F L L L I E E L L F A F Q K E A Q L T 174
ACTTTTCTCCTCTAATTAAGAGCTCCTGTTGCTTCCAGAAGGAGGCGCAGCTTACC 540
R R P K L L L S A A V S G D E Q I I K T 194
AGGCTCTCCCAAGCTGCTCTCTGCGCTGCTCTCTGGGGATGAACAAATCATCAAAACA 600
A Y E V L L L G R L L D F I S V L S Y D 214
GCTTATGAAGTCTCCTTCTGGGAAGCTCCTGGACTTCATCAGCGTCTTGTCTTACGAC 660
F H G S W E K F T G H N S P L F S L P G 234
TTTCATGGAAGCTGGGAAAAGTTACAGGACACAATAGTCCCTGTTCTCTGCTGGA 720
D P K S S A H A M K Y W R N L G A P P E 254
GACCCCAATCTTCGSCACATGCCATGAATACTGGCGAATCTGGGGCACCCCGAGAG 780
K L L M G L P T Y G R T F N L L K A S N 274
AAGCTCCTCATGGGCTCCCCACCTATGGACGGACGTTTAACTCCTCAAGGCCTCTAAT 840
N G L Q A E A K G V A L S G K Y T K Q D 294
AATGGGCTACAGGCTGAAGCTAAGGGTGTGCGCTTTCAGGAAAGTACACCAAGCAAGAT 900
G F L A Y Y E I C S F V Q K A T K R W I 314
GGCTTCTTGCTTATTATGAGATTTGCTCCTTCGTCAGAAAGCGACGAGCGCTGGATT 960
D Y Q H V P Y A Y K G N V W V G Y D D V 334
GACTATCAGCATGTCCCATACGCTACAAGGGGAATGTGTGGTTGGCTATGATGATGTC 1020
L S F S H K A K F I K G E N F G G A M V 354
CTCAGCTTCAGTCACAAGSCAAAGTTCATAAAGGAGAGAATTTTGGGGAGCCATGGTG 1080
W T L D L D D V K G T F C G T G P F P L 374
TGGACGTTGGACCTGGATGACGTTAAGGGCACTTCTGTGGCACTGGCCCTTCCCCCTT 1140
V S K L H S F L V Q A E F S S T P S P K 394
GTCTCCAAGTTGCATAGTTTCTGGTGCAAGCTGAGTTTCAGCTCAACTCCTTACCAAAA 1200
F W L S T A M N S L R T D R E S P T G T 414
TTTTGGCTCTCAACTGCTATGAATCTTTAAGAACTGACCGTGAAGTCCGACTGGAACC 1260
N D M G L L S S E G K S M A S N T H R K 434
AATGATATGGGGCTTTTGTCTCAGAAAGGAACTATGGCTTCTAACCCATAGGAAG 1320
S A D M T R G H Q S G I V T P T S E T M 454
TCTGCAGATATGACTAGAGGCCACAGAGTGGGATTGTGACCCCTACGAGTGAAGTATG 1380
S F G K H T V A V E M K T E T L G D A M 474
TCCTTTGGAAAGCACACTGTGGCTGTGGAATGAAGACTGAGACCCCTTGGAGACGCTATG 1440
T H G E M S M V S M H G Q T K S P G E K 494
ACTCACGGAGAGATGAGTATGGTTCTATGCATGGTCAGACTAAGTCCCTGGAGAGAAG 1500
I V P L G K R A V A P G M M T T P S R N 514
ATCGTGCCCTTGGAAAGAGAGCTGTAGCCCTGGAATGATGACTACCCCTCCAGAAAT 1560
L T V T P D R Q T K T L R R E P T T S E 534
ATTAGTCACTCCGGACAGGACCAAGACTCTTAGAAGAGAGCCCACTTCTGAG 1620
V D T D H H V G L Q T E A E S R R P S S 554
GTGGACACAGACCACATGTTGGTCTTCAGACGGAAGCCGAAAGCAGGAGCCATCCTCT 1680
G P V I * 594
GGCCCTGTCTAGCCCTAGGACACATTCCTCTTGTCTTTGGACAACCCCTGTGTTCCCA 1740
TTAATGGGAA 1750

```

Fig. 1. Nucleotide sequence of feline oviductin cDNA and deduced amino acid sequence. The possible signal peptide, the first 21 amino acids listed, is italic and stop codon is marked with an asterisk. One potential *N*-linked glycosylation site is double-underlined and six potential *O*-linked mucin type glycosylation sites are in open boxes. Potential heparin-binding site is underlined and two possible cholesterol recognition and/or interaction amino acid consensus (CRAC) domains are dashed-underlined. Exons are marked with vertical bars.

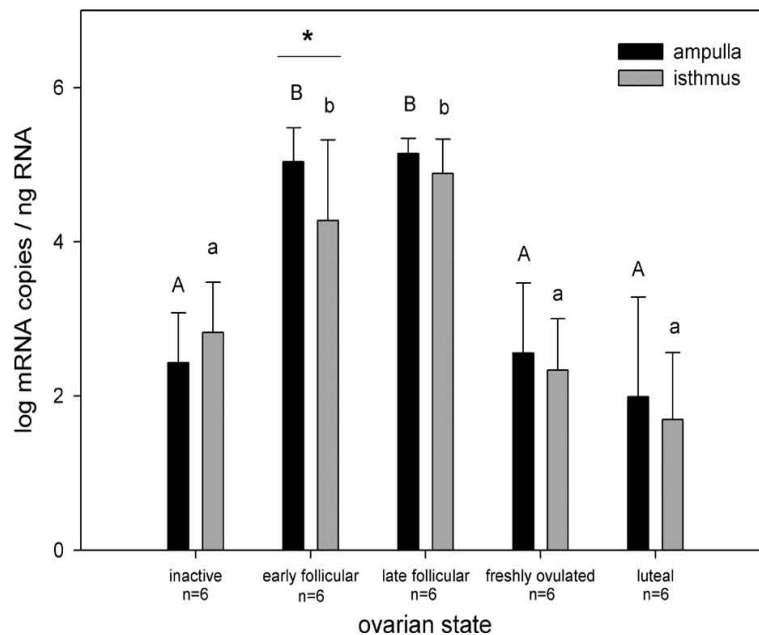


Fig. 2. Quantitative real time polymerase chain reaction (PCR) analysis of oviductin mRNA expression in the ampulla and isthmus of feline oviducts during five stages of the estrous cycle. Bars with different superscripts (capital letters: ampulla; lower case letters: isthmus) are significantly different ($P < 0.05$). Furthermore, statistical analysis showed a significant (*) difference in expression levels during early follicular stage ($P < 0.05$) in the ampulla and isthmus. Data are normalized and presented as log mean \pm SD.

stage an increase in cell height occurred with tall secretory and ciliated cells of about 45 μm . After ovulation and in the following luteal stage oviductal epithelium atrophied and secretory activity was no longer detectable.

4. Discussion

In the present study we identified and sequenced the full open reading frame for the oviductal glycoprotein oviductin of the domestic cat. The feline oviductin gene structure of 11 exons and 10 introns is very similar to the gene structure in human [27], mice [28], and hamster [29]. The predicted molecular weight of 62 kDa for the core protein differs from that of feline oviductin analyzed by immunoblotting (approximately 160 kDa) [30]. These differences are most likely due to posttranslational glycosylation. Feline oviductin protein contains one potential *N*-linked glycosylation site, identical to the protein in goat, sheep, and cow, and six potential mucin type *O*-glycosylation sites, being similar to the number found in human (9 *O*-glycosylation sites) and baboon (7 *O*-glycosylation sites) protein. In other species significant higher quantity of *O*-glycosylation sites

were found, for instance in goat (21 sites) and mouse (50 sites) [10].

Within the oviductal protein the more conserved N-terminal region of different species shows 74% to 80% identities to the feline protein sequence, whereas in the C-terminal region identities range only from 24% to 47%. Highest identity of 47% to the cat C-terminal region was found in the dog, another carnivore. The carboxy terminal area, which corresponds to exon 11 of the oviductin gene, can include Ser-Thr rich repeating polypeptides, a characteristic feature of mucin-type glycoproteins which were found in hamster, human, bovine, baboon [31], and mouse [7]. The domestic cat lacks this repeating sequence; only some truncated motifs of 2 to 3 amino acids similar to the hamster repeating unit are present. However, approximately 28% of amino acids in this area of the feline oviductin are Ser or Thr, which are possible acceptor sites for mucin type *O*-glycosylation [32].

Feline oviductin contains two potential CRAC domains [33] at amino acid position 138 (LFFLYPGVR) and 319 (VPYAYK). After alignment, similar domains in the same positions were discovered in all other species. Scolari et al. suppose that the CRAC domain, found in bovine seminal plasma protein PDC-109, me-

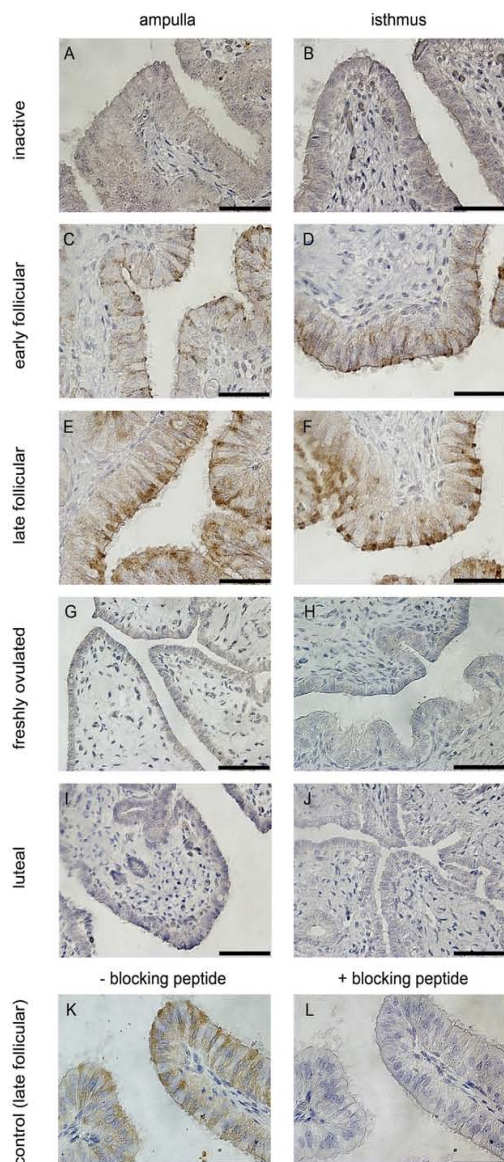


Fig. 3. Immunohistochemical localization of oviductin in the segments ampulla (A, C, E, G, I, K) and isthmus (B, D, F, H, J) during the inactive (A, B), early follicular (C, D), late follicular (E, F), freshly ovulated (G, H), and luteal (I, J) stage of estrous cycle. Early and late follicular stages show immunostained secretory cells interspersed with unlabeled ciliated cells. Absent immunoreactions in the control section (L) is shown. Bar, 50 μ m.

diates interaction between protein and cholesterol [34]. Release of cholesterol from human sperm cells leads to an increase of membrane fluidity which is important for the subsequent acrosome reaction [35]. Incubating bo-

vine sperm in vitro with oviductal fluid caused a loss of sperm cholesterol, whereas cholesterol concentration of boar sperms, incubated in ligated uteri, did not change [36]. Oviductin as an oviduct-specific glycoprotein might function as a sterol binding protein in the female reproductive tract, taking part in the regulation of sperm capacitation.

The present immunohistochemical studies have shown that during the estrous cycle feline oviductin was primarily detected in the early and late follicular stage and was not detectable during anestrus and after ovulation in the freshly ovulated and luteal stages. This protein expression pattern is also reflected on mRNA expression levels throughout the cycle. Oviductin mRNA levels were highest in the late follicular stage before the time of ovulation and declined in the freshly ovulated stage. In the domestic cat oviductin mRNA and protein expression appear to be upregulated with increasing estrogen concentrations. Expression pattern of mRNA and protein is consistent with circulating estrogen concentrations in the cat during the estrous cycle. In proestrus, which usually lasts less than one day, estrogen level starts to increase and ovarian follicles are present. In estrus, which lasts 5 to 7 days, advanced follicular development is visible and estrogen concentrations reach the maximum. This agrees with our observations; oviductin expression starts in the early follicular stage with increasing estrogen concentration and peaks in the late follicular stage [37]. After ovulation, progesterone level starts to increase and estrogen concentration declines to base level. This is consistent with results seen in human [1], baboon [2], and pig [4]. After ovulation, the progesterone-mediated suppression of the estradiol receptor system in cats [38] and the dramatic change in secretory activity in the oviduct can explain the rapid decrease of feline oviductin mRNA and protein seen in the freshly ovulated stages in immunohistochemistry and RT-qPCR analysis.

Feline oviductin mRNA expression does not differ between the two oviductal compartments, ampulla and isthmus, which is consistent with findings in human [39]. Only during the early follicular stage ampulla showed significantly higher mRNA copy numbers than the isthmus portion. We suggest that this difference does not have a biological cause considering the same expression pattern is seen during the early follicular stage in the immunohistochemistry. This is in contrast to findings in sheep, where oviductin mRNA was found in the fimbria and ampulla but was not detected in the isthmus. DeSouza and Murray [5] assumed a gradient

of steroid responsiveness in the oviduct resulted in different mRNA levels for an estradiol-dependent protein. In pigs, oviductin mRNA abundance in the ampulla was significantly higher than in the isthmus regardless of cycle stage, suggesting the ampulla as the primary site of oviductin expression [4]. There is no clear evidence that this mRNA expression pattern in pigs is reflected in protein level [14], but as the porcine isthmus appears to act primarily as the site of sperm storage, it would suggest that oviductin expression is mainly located in the ampulla for oviductin-oocyte interaction. In cow [40] and hamster [41] oviductin was shown to associate not only with the zona pellucida of oocytes but also with spermatozoa. Hunter [42] demonstrated that in pig, sufficient spermatozoa are already present in the caudal region of the isthmus within 60 min after mating. Spermatozoa accumulate and are stored in the isthmus up to 2 days until ovulation occurs and it becomes necessary for spermatozoa to reach the ampullary-isthmic junction where fertilization takes place. The relatively long storage time of porcine sperm cells within the isthmus in conjunction with low oviductin concentration might be sufficient for a potential oviductin-sperm binding. In the cat, 3 h after mating, the uterotubal junction and the uterine segments act as initial sperm reservoirs before ovulation occurs 25 to 32 h after copulation. Highest sperm numbers recovered by both flushing and counting in tissue sections were found in the isthmus 48 h after mating, indicating that spermatozoa amass to the site of fertilization which takes place mainly in the isthmic portion of the feline oviduct [43]. Feline spermatozoa appear to spend less time in the isthmus and, thus, high oviductin mRNA and protein levels would be necessary for potential sperm binding and affecting fertilization. Within the ampulla region, high oviductin protein expression levels are likely necessary for protein binding with the zona pellucida of ovulated oocytes in cats. Association of oviductin with the zona pellucida of ovulated oocytes could already be detected in the domestic cat by indirect immunofluorescence [30]. However, in our experiments oviductin expression was decreased in the freshly ovulated stages in which an interaction between protein and zona pellucida should occur. The question arises how oviductin-egg binding in the domestic cat comes off. In the present study all ovaries classified as “freshly ovulated” had a visible corpora hemorrhagica with a clear ovulation scar. No information is available how long these scars are detectable after ovulation, but it might be suggested that at least 1 to 2 days after ovulation they are still present. At that cycle stage

beginning progesterone secretion could have stopped the oviductin expression in the oviduct by leading to dedifferentiation of oviductal epithelium. Therefore, interaction of oviductin with ovulated oocytes has to proceed before the developing corpus luteum starts to synthesize progesterone. Another explanation can be that after ovulation, oviductin is completely secreted and stored in the lumen of the oviduct. Oviductin resides in the oviductal fluid and could interact with the ovulated oocyte.

In conclusion, characterization of the feline oviductin cDNA sequence revealed similarity to other mammalian species and our expression studies during the estrous cycle on both mRNA and protein level showed highest expression levels in the early and late follicular stages before ovulation, suggesting an estrogen-dependent regulation of feline oviductin. The domestic cat serves as a model species for threatened wild felids and basic research has yet to be done to elucidate mechanisms in reproduction biology in cats. Assisted reproduction technologies such as in vitro embryo production are important tools to manage rare populations in captivity and to maintain genetic diversity. Several functional studies in other species indicate that oviductin has direct effects on oocyte-sperm interactions, fertilization, and embryonic development and affect sperm capacitation, motility, and viability [10,18,21]. In the domestic cat, Lengwinat et al. found significant higher rates in fertilization and cleavage of in vitro matured oocytes incubated with feline oviductal epithelial cells from follicular stages during IVF [44]. Oviductin, as a major secretory product, could have taken part on these effects.

We suggest that feline oviductin might help to improve our IVF protocol [45] to obtain higher recovery of in vitro embryos. Further functional studies with purified protein will need to be done to examine the role of oviductin in fertilization and early embryonic development in domestic cats and other feline species.

Acknowledgments

The authors are grateful for the research funds supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG BR 4021/1-1). The authors thank Ms. Kim Carnaby for a critical reading of the manuscript.

References

- [1] Arias EB, Verhage HG, Jaffe RC. Complementary deoxyribonucleic acid cloning and molecular characterization of an estro-

- gen-dependent human oviductal glycoprotein. *Biol Reprod* 1994;51:685–94.
- [2] Jaffe RC, Arias EB, O'Day-Bowman MB, Donnelly KM, Mavrogianis PA, Verhage HG. Regional distribution and hormonal control of estrogen-dependent oviduct-specific glycoprotein messenger ribonucleic acid in the baboon (*Papio anubis*). *Biol Reprod* 1996;55:421–6.
 - [3] Sendai Y, Abe H, Kikuchi M, Satoh T, Hoshi H. Purification and molecular cloning of bovine oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod* 1994;50:927–34.
 - [4] Buhi WC, Alvarez IM, Choi I, Cleaver BD, Simmen FA. Molecular cloning and characterization of an estrogen-dependent porcine oviductal secretory glycoprotein. *Biol Reprod* 1996;55:1305–14.
 - [5] DeSouza MM, Murray MK. An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. *Endocrinology* 1995;136:2485–96.
 - [6] Suzuki K, Sendai Y, Onuma T, Hoshi H, Hiroi M, Araki Y. Molecular characterization of a hamster oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod* 1995;53:345–54.
 - [7] Sendai Y, Komiya H, Suzuki K, Onuma T, Kikuchi M, Hoshi H, et al. Molecular cloning and characterization of a mouse oviduct-specific glycoprotein. *Biol Reprod* 1995;53:285–94.
 - [8] Verhage HG, Mavrogianis PA, Boomsma RA, Schmidt A, Brenner RM, Slayden OV, et al. Immunologic and molecular characterization of an estrogen-dependent glycoprotein in the rhesus (*Macaca mulatta*) oviduct. *Biol Reprod* 1997;57:525–31.
 - [9] Merchán M, Peiró R, Santacreu MA, Francino O, Folch JM. Rabbit oviductal glycoprotein 1 gene: Genomic organization polymorphism analysis and mRNA expression. *Mol Reprod Dev* 2007;74:687–93.
 - [10] Pradeep MA, Jagadeesh J, De AK, Kaushik JK, Malakar D, Kumar S, et al. Purification, sequence characterization and effect of goat oviduct-specific glycoprotein on in vitro embryo development. *Theriogenology* 2011;75:1005–15.
 - [11] McBride DS, Boisvert C, Bleau G, Kan FW. Evidence for the regulation of glycosylation of golden hamster (*Mesocricetus auratus*) oviductin during the estrous cycle. *Biol Reprod* 2004;70:198–203.
 - [12] Buhi WC. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* 2002;123:355–62.
 - [13] Robitaille G, St-Jacques S, Potier M, Bleau G. Characterization of an oviductal glycoprotein associated with the ovulated hamster oocyte. *Biol Reprod* 1988;38:687–94.
 - [14] Buhi WC, Alvarez IM, Sudhipong V, Dones-Smith MM. Identification and characterization of de novo-synthesized porcine oviductal secretory proteins. *Biol Reprod* 1990;43:929–38.
 - [15] Wegner CC, Killian GJ. In vitro and in vivo association of an oviduct estrus-associated protein with bovine zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 1991;29:77–84.
 - [16] Gandolfi F, Modina S, Brevini TA, Galli C, Moor RM, Lauria A. Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona pellucida, perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *Eur J Basic Appl Histochem* 1991;35:383–92.
 - [17] Fazleabas AT, Verhage HG. The detection of oviduct-specific proteins in the baboon (*Papio anubis*). *Biol Reprod* 1986;35:455–62.
 - [18] McCauley TC, Buhi WC, Wu GM, Mao J, Caamano JN, Didion BA, et al. Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biol Reprod* 2003;69:828–34.
 - [19] Martus NS, Verhage HG, Mavrogianis PA, Thibodeaux JK. Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal specific glycoprotein. *J Reprod Fertil* 1998;113:323–9.
 - [20] King RS, Anderson SH, Killian GJ. Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J Androl* 1994;15:468–78.
 - [21] Abe H, Sendai Y, Satoh T, Hoshi H. Bovine oviduct-specific glycoprotein: A potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in vitro. *Mol Reprod Dev* 1995;42:226–32.
 - [22] Bakker J, Baum MJ. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Front Neuroendocrinol* 2000;21:220–62.
 - [23] Bareither ML, Verhage HG. Control of the secretory cell cycle in cat oviduct by estradiol and progesterone. *Am J Anat* 1981;162:107–18.
 - [24] Wildt DE, Chan SY, Seager SW, Chakraborty PK. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biol Reprod* 1981;25:15–28.
 - [25] Freistedt P, Stojkovic M, Wolf E. Efficient in vitro production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium: Effects of season and ovarian status. *Biol Reprod* 2001;65:9–13.
 - [26] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH 0034.
 - [27] Jaffe RC. Characterization of the human oviductal glycoprotein gene. *Biol Reprod* 1996;54 (Suppl. 1):74 (abstract 69).
 - [28] Takahashi K, Sendai Y, Matsuda Y, Hoshi H, Hiroi M, Araki Y. Mouse oviduct-specific glycoprotein gene: Genomic organization and structure of the 5'-flanking regulatory region. *Biol Reprod* 2000;62:217–26.
 - [29] Merlen Y, Bleau G. Organization of a gene coding for an oviduct-specific glycoprotein (oviductin) in the hamster. *Mol Reprod Dev* 2000;57:238–46.
 - [30] Robitaille G, Bleau G. Detection of a feline oviductin using a monoclonal antibody against hamster oviductin. *Biol Reprod* 1993;48 (Suppl 1):117.
 - [31] Malette B, Paquette Y, Merlen Y, Bleau G. Oviductins possess chitinase- and mucin-like domains: a lead in the search for the biological function of these oviduct-specific ZP-associating glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 1995;41:384–97.
 - [32] Strous GJ, Dekker J. Mucin-type glycoproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1992;27:57–92.
 - [33] Li H, Papadopoulos V. Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology* 1998;139:4991–7.
 - [34] Scolari S, Müller K, Bittman R, Herrmann A, Müller P. Interaction of mammalian seminal plasma protein PDC-109 with cholesterol: Implications for a putative CRAC domain. *Biochemistry* 2010;49:9027–31.
 - [35] Cross NL. Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biol Reprod* 2003;69:529–34.

- [36] Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 1998;59:7–11.
- [37] Brown JL. Female reproductive cycles of wild female felids. *Anim Reprod Sci* 2011;124:155–62.
- [38] West NB, Verhage HG, Brenner RM. Suppression of the estradiol receptor system by progesterone in the oviduct and uterus of the cat. *Endocrinology* 1976;99:1010–6.
- [39] O'Day-Bowman MB, Mavrogianis PA, Fazleabas AT, Verhage HG. A human oviduct-specific glycoprotein: synthesis, secretion, and localization during the menstrual cycle. *Microsc Res Tech* 1995;32:57–69.
- [40] King RS, Killian GJ. Purification of bovine estrus-associated protein and localization of binding on sperm. *Biol Reprod* 1994;51:34–42.
- [41] Kan FW, Esperanzate PW. Surface mapping of binding of oviductin to the plasma membrane of golden hamster spermatozoa during in vitro capacitation and acrosome reaction. *Mol Reprod Dev* 2006;73:756–66.
- [42] Hunter RH. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J Reprod Fertil* 1981;63:109–17.
- [43] Chatdarong K, Lohachit C, Linde-Forsberg C. Distribution of spermatozoa in the female reproductive tract of the domestic cat in relation to ovulation induced by natural mating. *Theriogenology* 2004;62:1027–41.
- [44] Lengwinat T, Pitra C, Blottner S. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in-vitro with epididymal sperm and coculture of feline oviductal epithelial-cells. *Reprod Dom Animals* 1993;28:236–43.
- [45] Waurich R, Ringleb J, Braun BC, Jewgenow K. Embryonic gene activation in in vitro produced embryos of the domestic cat (*Felis catus*). *Reproduction* 2010;140:531–40.

Artikel 2

Recombinant feline Oviductin - a powerful tool for functional IVF studies in the domestic cat

Recombinant Feline Oviductin – A Powerful Tool for Functional IVF Studies in the Domestic Cat

A Hachen¹, K Jewgenow¹, E Krause² and BC Braun¹

¹Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research (IZW), Berlin, Germany; ²Leibniz Institute for Molecular Pharmacology (FMP), Berlin, Germany

Contents

Oviductins are highly conserved proteins that seem to play an important role during fertilization and embryo development. A universal characteristic of oviductin is its association with the zona pellucida of ovulated oocytes, and several functional studies indicate an influence of this glycoprotein on reproductive events in mammals. The objective of this study was to produce recombinant feline oviductin in prokaryotic as well as eukaryotic cells as a prerequisite for analysing its influence on IVF in the domestic cat. Oviductin sequence was cloned into pET21b vector and transformed to *E. coli* to produce a recombinant His-tagged, non-glycosylated protein. Oviductin was isolated from *E. coli* lysate using anion exchange chromatography followed by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). Western blot analysis of affinity purified fractions resulted in one clear band corresponding to the expected size of ~67 kDa. The corresponding band of a coomassie-stained gel was analysed by mass spectrometry. Oviductin was identified with over 50 peptides covering 72% of the whole protein sequence. To obtain a glycosylated form of oviductin, eukaryotic cells were stable transfected with pSecTag/HygroA vector containing the oviductin gene sequence. The recombinant His-tagged protein was harvested from a serum- and protein-free cell culture medium. Mass spectrometry analyses of protein bands obtained after separation of the medium by SDS-PAGE detected oviductin peptides in protein bands of ~70, ~85 and ~170 kDa. With prokaryotic as well as eukaryotic produced recombinant feline oviductin, we are now able to use the protein for further functional IVF studies in the domestic cat.

Introduction

The domestic cat serves as a model species for wild felids, which are all listed on the IUCN Red List of threatened species. Protocols for *in vitro* production of embryos have been established for the domestic cat, but adaption to other felid species can be difficult because of the diversity in reproductive physiology among felids (Wildt et al. 1998). Keeping the *in vitro* condition as natural as possible is a way to circumvent problems in adapting *in vitro* protocols for a particular species. For this respect, knowledge on natural events taking place in the female reproductive tract during ovulation, fertilization and embryo development are essential. Oviductins belong to a family of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoproteins that were synthesized and released exclusively by the secretory, non-ciliated oviductal epithelium. The N-terminal region of this protein is highly conserved among species in contrast to the C-terminal region where different glycosylation patterns occur. Several functional studies demonstrated an influence of this glycoprotein on fertilization and early embryo development in mammals (Bui 2002).

A universal characteristic of oviductin is its association with the zona pellucida of ovulated oocytes during their oviductal transit. It has been suggested that oviductin is involved in the pre-fertilization zona pellucida hardening (Coy and Aviles 2010). In pig and cow, ovulated oocytes, flushed from the oviduct, show a 60- to 260-fold increase in the resistance of the zona to proteolysis compared to *in vitro* matured ovarian oocytes. This mechanism is mediated by oviductin. In pig, co-incubation of oocytes with purified porcine oviductin before IVF increased efficiency of fertilization and reduced the incidence of polyspermy even though penetration rate did not differ. Porcine embryos matured and fertilized *in vitro* show significant increase in cleaving and blastocyst formation when exposed to oviductin-supplemented medium suggesting embryotrophic effects of oviductin (McCauley et al. 2003). Similar results are observed in cow (Martus et al. 1998). Although it seems that oviductin has an influence on oocyte maturation, fertilization and embryo development, specific mechanism(s) behind these effects is still not clear. In the domestic cat, oviductin cDNA sequence is 1677 base pairs in length coding for a 558 amino acid protein with a calculated molecular mass of 62 kDa. Feline oviductin is also synthesized in an oestrogen-dependent manner. Oviductin mRNA and protein show highest expression levels in the late follicular cycle stage before the time of ovulation (Hachen et al. 2012). Therefore, we suggested that oviductin might also play a role in the domestic cat during fertilization and embryo development. The access to native feline oviductin from oviducts is very limited and also season dependent. Therefore, the aim of this study was the preparation of recombinant feline oviductin as a prerequisite for functional studies.

Materials and Methods

Cloning, transformation and expression of feline oviductin in *E. coli*

With specific primers, feline oviductin cDNA was prepared for the following cloning process. Using polymerase chain reaction, two binding sites for restriction enzymes were added to the cDNA sequence. This oviductin sequence was cloned into pET-21b vector (Novagen, Darmstadt, Germany), which carries a C-terminal His-tag sequence and transformed into competent *E. coli* JM109 cells. Positive clones were identified, and after control sequencing, the vector containing the oviductin gene (pET-21b-felOvn) was transformed into *E. coli* BL21DE3 expression host cells. The expected molecular weight of the resulting recombinant

protein was approximately 66.8 kDa. BL21DE3 cells were cultivated in lysogeny broth medium containing 100 µg/ml ampicillin. Expression of oviductin was induced at a certain concentration of the bacterial culture (OD₆₀₀ of 0.5) by addition of 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to the growing culture. After 4 h of incubation at room temperature and shaking at 150 rpm, bacterial culture was centrifuged in 50 ml falcon tubes at $8.900 \times g$ for 10 min at 4°C and cell pellets were stored at -80°C.

Cloning and transfection of CHO-K1

For expression in eukaryotic cells, pET-21b-felOvn was isolated from *E. coli* JM109 cells, digested with BamHI and NotI restriction enzymes (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany) and ligated into a eukaryotic expression vector (pSecTag/Hygro A; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), which contains a sequence for protein secretion and a C-terminal His-tag sequence. For sequence control, this construct (pSecTag-felOvn) was transformed into *E. coli* JM109. Isolation of pSecTag-felOvn for the following transfection procedure was performed using the GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Promega, Mannheim, Germany). For transfection, CHO-K1 cells (1.5×10^4 cells/100 µl), cultivated in a 96-well plate, were incubated with 100 ng pSecTag-felOvn using FuGENE HD Transfection Reagent (Biochrom, Berlin, Germany) according to the manufacturer's protocol. To achieve stable transfection, CHO cells were maintained in selection medium (Ham's F12; Serva, Heidelberg, Germany) with 10% foetal bovine serum, 50 µg/ml gentamycin, 250 µg/ml hygromycin B until distinct colonies were visible. Hygromycin B is an aminoglycoside that kills higher eukaryotic cells by inhibiting protein synthesis. Only cells transfected with the pSecTag/HygroA vector are able to express the gene for hygromycin B phosphotransferase, which will confer resistance to the drug hygromycin B. For protein analysis, transfected cells were cultivated 2–3 days in serum- and protein-free Octomed medium. The medium was harvested, mixed with 10% glycerol and stored at -80°C. For subsequent SDS-PAGE, the cell culture medium was concentrated by ultra filtration using Amicon Ultra-4 50 kDa cut off filter devices (Millipore, Billerica, MA, USA).

Isolation and purification of unglycosylated recombinant oviductin

For isolation of recombinant oviductin, thawed cell pellets were incubated for 30 min in 2 ml lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 mg/ml lysozyme, pH 7.5). The lysate was kept on ice and sonicated two times for 2 min with the Sonopuls HD 70 (Bandelin electronic, Berlin, Germany) at 20 kHz and 70% amplitude. The duty cycle was 0.5 s with 0.5 s of rest. Finally, sonicated cell suspension underwent three freeze-thaw cycles at -80°C followed by centrifugation at $20.000 \times g$ for 1 h at 4°C. The supernatant, containing soluble oviductin, was stored at -20°C until purification by anion exchange chromatography using the FPLC® System (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg,

Germany). The crude lysate was loaded onto a HiTrap Q HP anion exchange column (GE Healthcare, Munich, Germany) equilibrated with 20 mM Tris, pH 8.0. Proteins were eluted with a 45 ml linear gradient of 0 to 1 M NaCl in 20 mM Tris, pH 8.0 at a flow rate of 1 ml/min. In a second step, oviductin containing fractions were purified using immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). After changing the buffer to 20 mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7.0 using ultrafiltration with Amicon Ultra-15 30 kDa cut off filter devices, the protein sample was applied to a Tricorn 10/50 High Performance Column packed with Ni-loaded Chelating Sepharose Fast Flow. His-tagged oviductin was eluted with increasing imidazole concentrations (20–500 mM).

SDS-PAGE and Western blotting

Recombinant proteins were separated by SDS-PAGE using 10% polyacrylamide gels. Gels were either stained with coomassie brilliant blue or proteins were transferred to 0.2 µm nitrocellulose membrane for Western blot analysis. The membrane was blocked for 1 h in 3% BSA in 0.05% Tween-PBS and incubated overnight with monoclonal mouse anti-penta His (Qiagen, Hilden, Germany) antibody (diluted 1 : 2000 in 3% BSA in 0.05% Tween-PBS). The membrane was washed three times with 0.05% Tween-PBS and incubated for 1 h with goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Germany) conjugated to horseradish peroxidase (diluted 1 : 10000 in 0.05% Tween-PBS with 10% skim milk). Immune reaction was detected using the ECL Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare, Munich, Germany).

Protein identification (mass spectrometry)

Enzymatic digestion and nanoLC-MS/MS experiments were performed as previously described (Lange et al. 2010). In brief, after tryptic in-gel digestion, the extracted peptide solution was taken to dryness under vacuum and samples were reconstituted in 6 µl of 0.1% TFA, 5% acetonitrile in water. The peptides were analysed by a reversed-phase capillary liquid chromatography system (Eksigent 2D nanoflow LC; Axel Semrau GmbH, Sprockhövel, Germany) connected to an LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Mass spectra were acquired in a data-dependent mode with one MS survey scan in the Orbitrap and MS/MS scans of the most intense precursor ions in the LTQ. The generated peak lists (mgf) and the MASCOT server (VERSION 2.2; Matrix Science, London, UK) were used to search in-house against the SWISSPROT 2010.10 database (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Switzerland) supplemented with oviductin sequences (GenBank GU306151). A maximum of two missed cleavages was allowed, and the mass tolerance of precursor and sequence ions was set to 15 ppm and 0.35 Da, respectively. Acrylamide modifications of cysteine and methionine oxidation were considered as possible modifications. SCAFFOLD (VERSION 2.1.03; Proteome Software, Inc., Portland, OR, USA) was used to validate MS/MS

based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they could be established at >70.0% probability, as specified by the Peptide Prophet algorithm (Keller et al. 2002). Protein identifications were accepted if they could be established at >99% probability and contained at least two identified tryptic peptides.

Results

Detection of unglycosylated recombinant oviductin

The first purification step of unglycosylated oviductin was carried out by anion exchange chromatography. Western blot analysis of all fractions showed that recombinant oviductin was eluted with NaCl concentration between 400 and 700 mM. Positive fractions were pooled and further purified using IMAC. Here, oviductin was eluted with imidazole concentrations between 160 and 350 mM (Fig. 1a). Induction of 1 l bacterial culture with IPTG resulted in an overall protein yield of 120–150 mg, and after purification, approximately 1 mg protein was left. The SDS-PAGE profile of the eluted fractions contained a single protein band at the expected size of ~67 kDa (Fig. 1a, arrow) which was confirmed by Western blot analysis (Fig. 1b). In fraction 44 and 45, an additional strong protein signal at 40 kDa is visible, which did not react in the Western blot. Western blot showed also a clear signal in the first washing fraction (Fig. 1b, fraction 5).

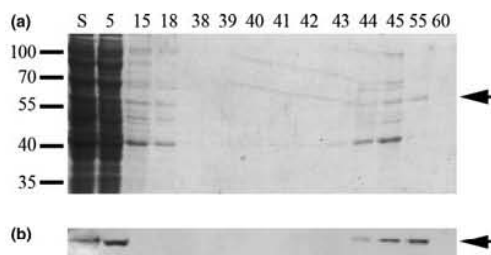


Fig. 1. Coomassie-stained SDS-PAGE (a) and Western blot (b) of protein fractions after Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography. Fraction 5: 18: flow through and washing steps; fraction 38–60: imidazole gradient. Feline oviductin is eluted with ~160 to ~350 mM imidazole (fraction 44–55). S, sample before chromatography.

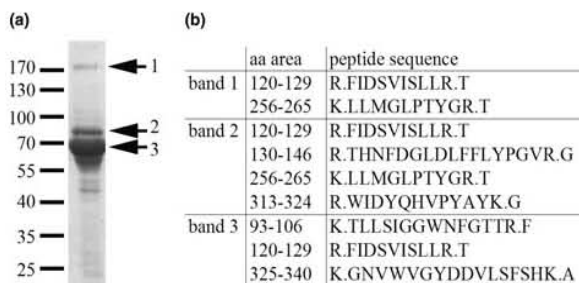


Fig. 2. Coomassie-stained SDS-PAGE of cell culture medium from one CHO-K1 cell clones (a), the corresponding oviductin peptides identified with mass spectrometry (b) and their localization within the amino acid (aa) sequence.

Detection of glycosylated recombinant protein

Culture medium from transfected CHO-K1 cell clones was separated with SDS-PAGE. Major protein bands were visible at ~70, ~85 and ~170 kDa (Fig. 2a, arrows). Western blot analysis of CHO-K1 culture medium using the anti-penta His antibody showed no specific signal.

Protein identification

Recombinant oviductin produced in *E. coli* could be clearly identified by mass spectrometry with 55 tryptic peptides covering 72% of the whole oviductin sequence. In contrast, eukaryotic produced oviductin was identified with two peptides within the 170-kDa band, four peptides in the 85-kDa band and three peptides in the 70-kDa band (Fig. 2b). The major part of identified peptides in these protein bands derived from bovine serum proteins like serum albumin, serotransferrin and bovine plasma protein alpha-2-macroglobulin. All identified peptide sequences of glycosylated oviductin were allocated to the N-terminal region (aa 1–385 of 558 aa) of the protein (Fig. 2b).

Discussion

In the present study, we demonstrate the production of recombinant feline oviductin in prokaryotic *E. coli* cells as well as in eukaryotic CHO-K1 cells. Oviductin is a glycoprotein that is exclusively expressed and synthesized in the oviduct. In the domestic cat, highest expression and release of the protein in the oviductal lumen occur during the late follicular cycle stage. Although we receive feline ovaries and oviducts regularly from the animal shelter Berlin, the sample size and quality are extremely fluctuating. Oviducts from late follicular cycle stage are mainly available during the reproductive season from March to May and from September to October. In addition, the amount of native protein obtained from oviductal flushes is very low. Therefore, we decided to produce recombinant feline oviductin to investigate the influence of oviductin on fertilization, cleavage and embryo development *in vitro*. Heterologous protein expression in *E. coli* is well defined and enabled us to produce high amounts of recombinant feline oviductin. Purification of the crude bacterial lysate with anion exchange chromatography and IMAC resulted in a relatively clean protein solution with only one stronger additional protein band at

40 kDa (Fig. 1a). This contamination can be removed by ultracentrifugation of the protein solution using 50 kDa cut off filter devices. Detection of oviductin in the flow through (Fig. 1, fraction 5) might present multimeric forms of the protein where the His-tag is not accessible for the column matrix. In contrast to *E. coli*, eukaryotic cells are able to perform post-translational modifications and to secrete glycoproteins that are correctly folded and fully active. Although we obtained stable transfected cell clones that were able to grow under selection pressure, the amount of recombinant oviductin in the cell culture medium seems to be very low. In a first approach, only 2–4 feline oviductin peptides were detected via mass spectrometry in protein bands from the separated medium. These protein bands contained other proteins with higher peptide counts, which were not related to oviductin. Although we cultured the cells in a special serum-free medium before harvesting, it seems that proteins of bovine origin from the normal growth medium remained in the culture. The glycosylation process of recombinant proteins in eukaryotic cells might be the reason for the low yield of recombinant oviductin. Glycoproteins have to undergo correct refolding inside the endoplasmic reticulum (ER) of the host cell. *N*-glycosylation and *O*-glycosylation occur also in the ER or the early part of the Golgi complex. Misfolded proteins are immediately retained and eventually degraded (Gray 1997). Only correctly folded and glycosylated proteins are secreted to the medium. It might also be suggested that an incomplete secretion of the protein into the medium occurs. It is known that a number of proteins are not normally secreted by mammalian cells. Recombinant protein is retained in the cell or on the cell surface or accumulates in the Golgi or ER (Gray 1997).

Feline oviductin peptides could be identified in protein bands of different molecular size (Fig. 2a). We suggest that this pattern reflects different glycosylation stages as at least two of the bands had a higher molecular weight than the calculated weight for the unglycosylated form. However, smaller fragments might be a result of proteolysis and glycosidase activity. CHO-K1 selection medium is supplemented with foetal bovine serum that contains endogenous protease inhibitors. When cultured with this medium, cells should be protected from proteolysis. Before harvesting the culture medium, cells were incubated 2–3 days in serum-free medium to reduce the protein contamination originated from the growth medium. In such a medium, cell viability may decrease at the end of culture and intracellular proteases and glycosidases are released. This may result in proteolysis and carbohydrate chain degradation of the protein. All peptides from eukaryotic cell culture supernatant that were identified as feline oviductin were located within

the *N*-terminal region of the protein. In the carboxy terminal region, feline oviductin contains one putative *N*-linked glycosylation site and six *O*-linked glycosylation sites (Hachen et al. 2012). Because of carbohydrate chains of the mature protein, molecular mass of the tryptic peptides generated for mass spectrometry is changing, which makes the identification of oviductin peptides difficult. In contrast, peptides from prokaryotic produced oviductin were allocated over the whole sequence, showing that in prokaryotic cells, no post-translational modification occurs. *C*-terminal glycosylation might also be a cause that we obtained no specific signals in Western blot analysis using the anti-penta His antibody (not shown) as polyhistidine sequence is also located at the *C*-terminal region. Although glycosylated oviductin should be denaturated for SDS-PAGE and subsequent Western blot, it might be possible that carbohydrate chains influence epitope recognition of the antibody.

In summary, we generated an unglycosylated recombinant form of feline oviductin, produced in *E. coli*, whereas glycosylated protein was synthesized in stable transfected eukaryotic cells. As native oviductin from domestic cats cannot be obtained in sufficient quantities, we are now able to obtain this protein independently of the natural source. However, in contrast to the production in *E. coli*, production of recombinant oviductin in mammalian cells is a challenging process. If the purified protein is available in sufficient quantities, we will investigate whether the recombinant protein is able to improve IVF and/or embryo culture in the domestic cat. Functional studies with recombinant proteins, relevant for reproductive research, have already been performed for example in human (Garde et al. 2007) and goat (Cajazeiras et al. 2009). Studies with oviductin produced in *E. coli* without post-translational modifications might elucidate the influence of the oviductin carbohydrate side chains on reproductive processes.

Acknowledgement

The authors are grateful for the research funds supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG BR 4021/1-1).

Conflicts of interest

The authors confirm that any financial or personal relationship that could inappropriately bias or influence this study can be excluded.

Author contributions

Alexandra Hachen performed the experiments and drafted the manuscript. Eberhard Krause performed mass spectrometry. Beate C. Braun and Katarina Jewgenow contributed to the design of the study and to the drafted paper.

References

- Buhi WC, 2002: Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* **123**, 355–362.
- Cajazeiras JB, Melo LM, Albuquerque ES, Radis-Baptista G, Cavada BS, Freitas VJ, 2009: Analysis of protein expression and a new prokaryotic expression system for goat (*Capra hircus*) spermadhesin Bdh-2 cDNA. *Genet Mol Res* **8**, 1147–1157.
- Coy P, Aviles M, 2010: What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte? *Biol Rev Camb Philos Soc* **85**, 593–605.
- Garde S, Fraser JE, Nematpoor N, Pollex R, Morin C, Forte A, Rabbani S,

- Panchal C, Gupta MB, 2007: Cloning, expression, purification and functional characterization of recombinant human PSP94. *Protein Expr Purif* **54**, 193–203.
- Gray D, 1997: Overview of protein expression by mammalian cells. *Current Protocols in Protein Science* (Suppl. 10), 5.9.1–5.9.18.
- Hachen A, Jewgenow K, Braun BC, 2012: Sequence analysis of feline oviductin and its expression during the estrous cycle in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* **77**, 539–549.
- Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R, 2002: Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* **74**, 5383–5392.
- Lange S, Sylvester M, Schümann M, Freund C, Krause E, 2010: Identification of phosphorylation-dependent interaction partners of the adapter protein ADAP using quantitative mass spectrometry: SILAC vs 18 O-labeling. *J Proteome Res* **9**, 4113–4122.
- Martus NS, Verhage HG, Mavrogianis PA, Thibodeaux JK, 1998: Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal specific glycoprotein. *J Reprod Fertil* **113**, 323–329.
- McCauley TC, Buhi WC, Wu GM, Mao J, Caamano JN, Didion BA, Day BN, 2003: Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biol Reprod* **69**, 828–834.
- Wildt DE, Brown JL, Swanson WF, 1998: Cats. In: Knobil E, Neill JD (eds), *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, New York, NY, pp. 497–510.

Submitted: 31 May 2012; Accepted: 6 July 2012

Author's address (for correspondence):
Alexandra Hachen, Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, PF 700430, 10324 Berlin, Germany. E-mail: hachen@izw-berlin.de

Artikel 3

The influence of recombinant feline Oviductin on different aspects of domestic cat (*Felis catus*)
IVF and embryo quality



The influence of recombinant feline oviductin on different aspects of domestic cat (*Felis catus*) IVF and embryo quality

Romy Hribal^{*,1}, Alexandra Hachen¹, Katarina Jewgenow, Jennifer Zahmel, Lorena Fernandez-Gonzalez, Beate C. Braun

Department Reproduction Biology, Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2014

Received in revised form 21 May 2014

Accepted 5 June 2014

Keywords:

Oviductin

Domestic cat

IVF

Sperm binding

Embryo quality

ABSTRACT

Oviductin is known to be a key player providing a convenient environment for the process of fertilization affecting this by direct interaction with oocytes and sperm. As *in vitro* embryo production in the context of assisted reproduction for endangered felids is still in the process of optimization, oviductin might be used to improve IVF results. Recombinant His-tagged feline oviductin was expressed by transformed *Escherichia coli* BL21DE3 cells. The protein was purified by immobilized metal ion affinity chromatography. The effect of the recombinant protein was characterized in three experiments: a hemizona assay for sperm binding analysis, the IVF outcome, and the relative mRNA expression levels in blastocysts after IVF. A significant higher number of bound sperm cells were found after incubation in oviductin. No significant effect on cleavage, morula, and blastocyst rates with or without oviductin incubation during IVF could be observed. However, the relative mRNA abundance of *GJA1*, a gene, whose expression level is known to be a marker of embryo quality, was significantly increased (P value less than 0.05) in blastocysts after oviductin treatment. In contrast to this, expression of *OCT4*, *HSP70*, *DNMT1*, *DNMT3A*, *BAX*, *IGF1R*, and *GAPDH* was not significantly affected. We assume that our recombinant oviductin in its current nonglycosylated form is able to enhance sperm binding. Despite of a missing significant effect on IVF outcome, embryo quality in terms of relative *GJA1* expression is influenced positively. These promising results demonstrate the value of recombinant oviductin for the IVF in cats.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Oviductin (oviduct-specific glycoprotein) is known to contribute to several processes occurring in the oviduct involved in fertilization and early embryo development. It is described for a variety of mammalian species and found predominantly expressed (mRNA and protein) and secreted during estrus in the oviduct [1–6]. Its highly conserved cDNA and protein sequence, especially at the N-terminus, taken together with its expression restricted to the

nonciliated epithelial cells of the oviduct and underlying cyclicity depending on circulating estrogen, leading to the conclusion that it possesses a very essential and basic function in mammalian reproductive processes [7]. Oviductal secretions, with emphasis on oviductin, are discussed to be a key factor that could contribute to improve the developmental rates and embryo quality in *in vitro* embryo production (IVP) in the context of assisted reproductive techniques (ARTs) [8]. IVF outcome was improved in cows and goats [9,10]. Furthermore, ZP resistance toward pronase and monospermy was increased in porcine and bovine oocytes [11]. It has been shown that oviductin binds the zona pellucida (ZP) of oocytes and early embryos [12] and that it is present in the perivitelline space, in blastomere membranes [13], and even in the blastomere

* Corresponding author. Tel.: +49 30 5168 619; fax: +49 30 5126 104.
E-mail address: hribal@izw-berlin.de (R. Hribal).

¹ The first two authors contributed equally to this work.

cytoplasm [14]. It was also found to bind to different (species-specific) regions of sperm cells [15,16] to enhance capacitation and fertilization rates of preincubated bovine sperm [17] and to keep sperm viable for a longer time and motile under *in vitro* conditions [18]. Together, these results demonstrate the valuable potential of oviductin when applied in routine IVP.

The domestic cat serves as a model to develop and improve ART for wild felid species. The majority of these species are described as vulnerable, endangered, or even critically endangered on the International Union for Conservation of Nature red list (www.iucnredlist.org). Cat's IVM, IVF, and IVC [19–22], as well as intracytoplasmic sperm cell injection [23,24] and sperm cryopreservation [25], have been routinely and successfully applied for more than 2 decades. Blastocyst rates ranging from 25% to 50% and more can be achieved after IVM and IVF in cats [22,26,27], however, some *in vitro* artifacts, such as impaired blastocyst hatching [28], remain. Moreover, less obvious effects of *in vitro* culture-like epigenetic modifications or gene expression alterations with almost unknown long-term impacts are known to occur as within other species [29]. To overcome these challenges, it is essential to create an *in vitro* environment as near as possible to *in vivo* conditions. As oviductal secretions, especially oviductin, seem to be of fundamental importance for fertilization and embryonic developmental events, the inclusion of them into the *in vitro* culture is logical. For functional studies in other species, mostly native oviductin purified from oviductal fluid or even complete oviductal fluids were used [30–33]. As native feline oviductin is difficult to obtain in sufficient amounts, recombinant oviductin is a reasonable alternative. For that, we successfully generated prokaryotic and eukaryotic clones, both producing feline oviductin [34]. The prokaryotic, nonglycosylated form could be enriched satisfactorily, whereas the purification of the eukaryotic, glycosylated protein was challenging [34]. Due to this, we present here the effect of recombinant prokaryotic nonglycosylated feline oviductin on three different aspects of cat *in vitro* fertilization and embryo production: (1) sperm binding to the ZP, (2) IVP outcome, and (3) gene expression in blastocysts. To our knowledge, this is the first study analyzing the effect of pure oviductin in the cat and is one of the first studies applying a recombinant-produced oviductin. It provides new interesting information about the effects of oviductin on cat IVF and presents promising results on the usefulness of recombinant-expressed oviductin in ART.

2. Materials and methods

Ovaries and testes were obtained after routine castration by a local veterinary clinic. All chemicals were purchased from Sigma Aldrich GmbH (Taufkirchen, Germany), unless otherwise stated. Ovaries and testes were stored at 4 °C and transported in a styrofoam box to the laboratory as described [24,26]. On arrival, the ovaries were processed immediately, whereas the testes were stored without any medium at 4 °C and processed 24 hours after ectomy. We described the recombinant production of prokaryotic purified oviductin previously [34].

2.1. Hemizona assay

Ovaries were sliced in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) with 3 mg/mL bovine serum albumin (BSA-DPBS). Collection of cumulus-oocyte complexes (COCs) was performed under a stereomicroscope (Stemi 2000-C, Zeiss, Jena, Germany). Oocytes were denuded from cumulus cells by gently pipetting them with a 125- μ m pipette tip (Gynemed GmbH, Lehnshausen, Germany).

Hemizonae were prepared on an inverted microscope (Axiovert 100, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a micromanipulator (Eppendorf, Hamburg, Germany). A 1.48- μ m diode laser (Saturn Active-Laser; Research Instruments, Falmouth, UK) for bisecting the oocytes was provided by the Gynemed GmbH. During bisection, the oocytes were fixed to a holding pipette (Gynemed GmbH). The ZP was removed equatorially by drilling one hole after another in a series of about 11 shots with 2000 ms from one end of the oocytes to the other end. The oocyte was then rotated around the equatorial axis for 180°, and the reverse side was treated similarly. With the help of an injection pipette (Gynemed GmbH), both hemizonae were dispersed (Fig. 1). Ooplasmic remnants were removed using injection and holding pipette. Zona pellucida pairs were transferred to Microwell Minitrays (Sigma Aldrich) containing 15 μ L DPBS with 2 M DMSO freezing solution per well. Microwell minitrays were then stored at –80 °C until processing. After thawing, the ZP halves were washed in BSA-DPBS before they were incubated with 5×10^5 /mL motile frozen-thawed sperm in the presence (experimental group) or absence (control group) of 100 μ g/mL recombinant oviductin. Here, for each zona half incubated in oviductin, the correspondent other half served as the control without oviductin. After incubation overnight in a humidified atmosphere at 5% CO₂ and 38.5 °C, the ZP halves were washed three times in BSA-DPBS to remove loosely attached sperm cells and fixed in 3.7% paraformaldehyde solution. The ZP halves were washed again and incubated in 1 μ g/mL diamidin-phenylindol (DAPI) solution for subsequent counting of stained sperm cells bound to each zona half under ultraviolet light on a fluorescent microscope (Leica



Fig. 1. Oocyte and zona pellucida halves after laser bisection.

DMLB, Leica GmbH, Wetzlar, Germany). The sperm-binding assay was performed in three replicates including sperm of three different tomcats per replicate.

2.2. In vitro embryo production

Ovaries were sliced for COC release in Medium 199 with Earles salts supplemented with 3 mg/mL BSA, 0.1 mg/mL cysteine, 1.4 mg/mL HEPES, 0.25 mg/mL sodium pyruvate, 0.6 mg/mL sodium lactate, 0.15 mg/mL L-glutamine, and 0.055 mg/mL gentamycin as described above. IVM of oocytes with a uniform dark cytoplasm and at least three surrounding cumulus cell layers occurred in the presence of 0.02 IU/mL porcine FSH and 0.05 IU/mL porcine LH (Sioux Biochemical, Inc., IA, USA) for approximately 24 hours. Sperm for IVF were either freshly recovered from the ductus deferens and cauda epididymis by mincing both in supplemented Tyrode's salt solution (with 6 mg/mL BSA, 1.2 mg/mL HEPES, 1.1 mg/mL sodium lactate, 0.1 mg/mL sodium pyruvate, and 0.15 mg/mL L-glutamine) or, if testes were not available, by thawing previously cryopreserved semen samples (cryopreservation as described previously [24,26]). Fresh semen was centrifuged for 8 minutes at $300 \times g$; the supernatant was removed and the pellet was carefully overlaid with 50 μ L fresh medium to allow a swim-up for 30 minutes. The frozen semen samples were thawed in a water bath at 38 °C, washed in supplemented Tyrode's salt solution, and subjected to centrifugation and swim-up procedure. The oocytes were equally and randomly distributed to the experimental and control group. IVF occurred in supplemented Tyrode's salt solution with 10 μ g/mL heparin. To this, oviductin, diluted in supplemented Tyrode's salt solution (experimental group) or only supplemented Tyrode's salt solution (control group) were added. The final concentration of oviductin in the experimental group was 100 μ g/mL. Oocytes were coincubated for 18 hours with 2×10^5 /mL fresh sperm or 1×10^6 /mL frozen-thawed sperm. Next, the two groups of presumptive zygotes were transferred into Hams F10 supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 0.1 mg/mL sodium pyruvate, 0.15 mg/mL L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin and controlled daily for their developmental progress. Cleavage rates were determined after 24 hours post-IVF and calculated as the proportion of oocytes that cleaved at least to the two-cell stage from the total number of oocytes subjected to IVM/IVF. Morula and blastocyst rates were calculated as the proportion of embryos reaching the specific developmental stage from all cleaved oocytes at Day 4 or 5 (morula) and Day 7 to 9 (blastocyst) post-IVF, respectively.

2.3. Gene expression analysis

Single blastocysts were stored in 5 μ L RNA later (Qiagen, Hilden, Germany) in –80 °C until RNA extraction. Messenger RNA from individual embryos was obtained with the Dynabeads mRNA Direct Kit (Life Technologies, Darmstadt, Germany) following the manufacturer's instructions with modifications. The embryos were lysed in 280 μ L lysis buffer by vortexing for 30 seconds and subsequent incubation at room temperature for 10 minutes. As

an internal exogenous control, 1 pg rabbit globin RNA was added to each sample. After lysis, 20 μ L prewashed beads were added to each sample, followed by 20 minutes incubation on a tube rotator at room temperature. Magnetic separation of the bead-bound RNA occurred by putting the reaction tube on a magnetic separator (Promega GmbH, Mannheim, Germany) and removing the supernatant. The samples were then washed once in 600 μ L washing buffer A by pipetting followed by magnetic separation and washed twice in 300 μ L washing buffer B. The RNA was eluted in 10 μ L RNase-free water, incubated at room temperature for 3 minutes, and then further incubated at 80 °C for another 3 minutes and transferred onto the precooled magnet on ice. The supernatant was transferred into a fresh reaction tube on ice and was used for reverse transcription. The elution procedure was repeated once. For cDNA synthesis, the RevertAid First-Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Schwerte, Germany) was applied according to the manual's instructions. The reaction occurred in a 40- μ L volume with the whole amount of extracted mRNA. The cDNA was stored at –20 °C. Real-time quantitative PCR was used for gene expression measurements of eight genes of interest (heat shock protein 70 (*HSP70*), BCL2-associated X protein (*BAX*), octamer-binding transcription factor 4 (*OCT4*), DNA methyltransferases 1 and 3A (*DNMT1* and *DNMT3A*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF1R*), and gap junction protein alpha 1 (*GJA1*)). Beta-actin (*ACTB*) was used as an endogenous control. Relative mRNA abundances were analyzed in 16 blastocysts derived from IVF in the presence of oviductin and 13 blastocysts that were produced without oviductin incubation as a control. Amplification was performed in a CFX96 cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany) using the SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad). For that, cDNA corresponding to 0.025 (Globin, *HSP70*, *BAX*, *OCT4*, *DNMT1*, *DNMT3A*, *IGF1R* and *GAPDH*), 0.01 (*ACTB*), or 0.05 (*GJA1*) embryo equivalents (diluted in sterile filtered Aqua bidest.) was added to 5 μ L Supermix and 0.5 μ L forward and reverse primer (final primer concentration 500 nM) each. The PCR program consisted of an initial heating step for 2 minutes at 98 °C and 40 cycles of 8 seconds at 98 °C and 8 seconds at primer-specific annealing/elongation temperatures. Primer sequences were either already known from previous studies of our group or designed on the basis of specific sequences available in the Pubmed database Nucleotide (www.pubmed.com). For primer sequences, specific annealing temperatures, fragment lengths, and references see Table 1. To confirm the presence of a single amplification product and the absence of primer dimers and unspecific products, melting curve analysis was performed from 65 °C to 95 °C in 0.5 °C steps, each lasting for 5 seconds.

Amplification was performed in duplicates; H₂O was used instead of cDNA in nontemplate controls to check for contamination. To generate a standard curve for each gene (from 10^1 to 10^6 molecules per reaction), a recombinant linearized plasmid DNA derived from cloned cDNA was created. Normalization was performed by applying rabbit globin quantities as exogenous and *ACTB* quantities as endogenous internal standards. Relative mRNA abundances

Table 1

Primer sequences, sequence references, or accession numbers of sequences used for primer design, specific annealing temperatures, and resulting fragment lengths from primers used for real-time quantitative PCR.

Gene	Primer sequence	Primer reference or accession number	Annealing temperature (°C)	Fragment length (bp)
<i>DNMT1</i>	Forward: GCG GCT CAA AGA TTT GGA AAG Reverse: GGA TTT GAC TTT AGC CAG GTA	[22]	53.9	172
<i>DNMT3A</i>	Forward: GAT CAT GTA CGT CGG GGA C Reverse: GAT GTC CCT CTT GTC ACT AAC	GQ500998	52.0	268
<i>GJA1</i>	Forward: CCA TCT TCA TCA TCT TCA TGC Reverse: CTT GTA CCC AGG AGG AGA CA	[22]	53.4	242
<i>OCT4</i>	Forward: GAA CAT GTG TAA GCT GCG GC Reverse: CTT GAT CGT TTG CCC TTC TG	GQ848232	62.0	172
<i>BAX</i>	Forward: CCG ATG GCA ACT TCA ACT GGG Reverse: GAT GGT CAC TGT CTG CCA CGT C	NM_001009282	63.0	244
<i>HSP70</i>	Forward: CCA TGA CGA GGG ACA ATA AC Reverse: CAT GGC CGT GAC GTT CAG G	HF546215	61.3	190
<i>ACTB</i>	Forward: ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA Reverse: CTC CAG GGA GGA CGA GGA C	[6]	62.5	169
<i>GAPDH</i>	Forward: AAG GGT GGG GCC AAG AGG Reverse: AGA GGG GCC AGG CAG TTG	[6]	63.5	124
<i>IGF1R</i>	Forward: CAG AGT GGA TAA CAA GGA GAG Reverse: CAT TAG AAT CAG TCC ATT GGG	[22]	53.0	254
<i>Globin</i>	Forward: GCA GCC ACG GTG GCG AGT AT Reverse: GTG GGA CAG GAG CTT GAA AT	X04751	60.5	257

for the genes of interest were calculated by dividing the quantities of each transcript by the corresponding normalization factor (quotient of *ACTB* divided by globin).

2.4. Statistical analysis

The data were statistically analyzed with PSAW Statistics 18.0 (SPSS Inc., IBM Corporation, NY, USA). For the comparison of the number of sperm bound to each ZP-half after incubation in the presence or absence of oviductin a paired t-test was used. Cleavage, morula, and blastocyst rates were compared by Mann–Whitney U-test. Relative mRNA abundances in blastocysts produced with or without oviductin incubation were analyzed by an independent sample t-test.

For excluding an effect of the sperm source (fresh and frozen-thawed) on developmental rates and mRNA expression, we performed IVF always in parallel with and without oviductin with the same sperm pool (either fresh or cryopreserved). Furthermore, we tested statistically if there is a significant influence of sperm cryopreservation on developmental rates and/or gene expression. Cleavage rates tended to be lower when frozen-thawed semen was used (data not presented here), but as this difference was not significant and there was also no significant influence on gene expression, and, moreover, every IVF experiment was done in parallel in both the experimental as well as the control group, we decided to combine the data from the different sperm sources to obtain a bigger sample size.

3. Results

3.1. Influence of oviductin on sperm binding

A total of 50 ZP, each cut into two halves with one incubated in the presence and the other in the absence of recombinant oviductin, were examined for sperm binding

in this experiment. On average, 161.3 ± 16.0 and 109.4 ± 13.5 (mean \pm SEM) spermatozoa were counted bound to zona halves that were incubated in oviductin and without oviductin, respectively. This difference was highly significant ($P < 0.0001$, Fig. 2).

3.2. Influence of oviductin on in vitro embryo production success

In vitro fertilization with (experimental group) or without (control group) oviductin occurred in 17 different IVF runs (nine with frozen-thawed semen and eight with fresh semen) with a total of 429 oocytes. The mean cleavage rates and morula rates as percentages from cleaved oocytes were similar in the experimental and control group (Table 2). A slightly higher percentage of embryos developed into blastocysts in the presence of oviductin in comparison to the

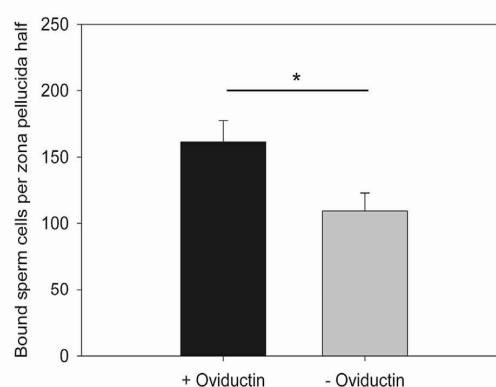


Fig. 2. Sperm binding to zona pellucida halves. Number of sperm cells bound to corresponding zona halves in presence (+Oviductin, black bar) or absence (–Oviductin, gray bar) of recombinant oviductin. Values are shown as mean \pm SEM, * $P < 0.05$.

Table 2

Cleavage, morula, and blastocyst rates after IVF in presence (+Oviductin) or absence (–Oviductin) of recombinant oviductin; values are shown as mean \pm SEM.

Group	Oocytes (n)	Cleavage (%)	Morula (%)	Blastocyst (%)
+Oviductin	219	36.1 \pm 4.9	73.7 \pm 6.5	35.9 \pm 8.8
–Oviductin	210	37.7 \pm 4.4	72.6 \pm 7.0	27.2 \pm 6.0

control group. However, all developmental rates did not differ statistically between the two groups.

3.3. Influence of oviductin during IVF on relative mRNA abundances

The expression of seven different genes of interest plus rabbit globin and *ACTB* as controls was examined in 16 (+Oviductin) and 13 (–Oviductin) single blastocysts. No significant influence of treatment with oviductin during IVF could be seen on relative *DNMT1*, *DNMT3A*, *OCT4*, *HSP70*, *BAX*, *IGF1R*, and *GAPDH* abundances (Fig. 3). In contrast to this, significantly higher levels of *GJA1* transcripts ($P = 0.024$) were detected in blastocysts obtained by IVF in the presence of oviductin in comparison to IVF without oviductin (Fig. 3).

4. Discussion

Although a lot is known about the positive effect of estric oviductal fluids and purified oviductin on several components of IVF and IVP [9–11,16,31,35], the protein is still far from its routine application. A reason for this may be that oviductal fluid from estric animals, especially those whose reproduction underlies seasonality, is simply not available at the moment when it is needed, or, especially in smaller animals, the quantity is not sufficient. Therefore, producing oviductin recombinantly offers a great opportunity to gain independence of the availability of estric oviductal fluid.

Here, we report for the first time the application of recombinant oviductin, expressed by *Escherichia coli*, in a domestic cat *in vitro* system. Besides that, only one report about the positive impact of recombinant-derived oviductin, also from *E. coli*, on buffalo sperm viability and acrosome reaction is available [4]. We were able to show a clear effect of the protein on the number of sperm binding to the ZP and a significant influence on *GJA1* expression in blastocysts after IVF in the presence of it. However, no effect was seen on fertilization and embryo development rates.

The increase of sperm binding caused by the addition of recombinant oviductin found in the present study contradicts the results from pig studies [11,31,35] but confirms the findings in humans [33]. Possibly, those contradicting results are caused by species-specific interaction of oviductin with either sperm cells and/or oocytes.

Some studies suggest that posttranslational modifications of the protein, such as peptide glycosylation, have a biological function [36,37]. Another study provides evidence by blocking development in mouse embryos from the two-cell stage onward by incubating in the presence of

a specific antibody against the C-terminal peptide of oviductin that the native protein itself has broad embryotrophic effects [38]. The increased *GJA1* expression found in our experiment might be also an indication for an embryotrophic effect in cats (see discussion below). However, it was shown that oviductin can interact with both the oocyte and the sperm cell [12–14,16,17], and maybe different parts of the protein are responsible for reacting with the two different gametes. We have taken into account that the recombinant oviductin expressed by *E. coli* is non-glycosylated and may miss therefore some but not all properties of the native one. This could explain the increased sperm binding but the missing effect on IVF outcome is found in the present study. Potentially, the protein acts species-specifically and prevents polyspermy especially in the pig [11], where it is a common phenomenon of *in vitro* culture in contrast to cat *in vitro* embryo production.

A positive effect of native oviductin or oviductal fluid on the fertilization rate in cows [9,17], cleavage and blastocyst rates in pigs [32,35], and cleavage, morula and blastocyst rates in goats [10] were described. In the contrary, we could not determine any influence of recombinant oviductin on cleavage and morula rates in the cat *in vitro* culture system and only a slightly increased blastocyst rate after the presence of the protein. Seeing no statistic significant difference could have various reasons. First of all, variation of developmental rates between the different experiments was very high, probably due to a varying sample quality. As ovaries and testes were obtained from the animal shelter and predominantly from straying cats, information about age, nutrition, and general living conditions are mainly unknown. Second, the observed effect could be less profound because, as explained above, the recombinant protein could be beneficial to some aspects of gamete interaction, but posttranslational modifications could be needed for effects on the fertilization rate. And indeed, IVF rates in cats could be improved by coculture with fresh feline oviduct cells [39]. However, culture on oviductal monolayers did not evoke any effect on developmental rates [40]. This could be explained by the relatively long culture period of the cells used in the cited study for cocubation: the oviductal cells were cultured for at least 12 days before being introduced into cat IVF. Within our own experience, cultured oviductal cells and, especially, adherent cells lose their ability to express oviductin the longer they are cultured (unpublished data). Third, we added oviductin only during sperm–oocyte cocubation, a relatively short interval of 18 to 19 hours, to the culture. Maybe a prolonged incubation time, extended to the first days of embryo development, could intensify the effect. The facts that in the cat the isthmus also produces oviductin [6] and cat embryos spend approximately the first 4 days of their development within the oviduct [41] argue for this suggestion. Against it might be the fact that after ovulation, the oviductin production decreases dramatically [6]. In studies dealing with other species, oviductin treatment occurred during embryo development [35] or even during IVM, IVF, and IVC [10] and increased embryo developmental rates. However, in the porcine *in vitro* system a 30-minute incubation of the oocyte with oviductal fluid before

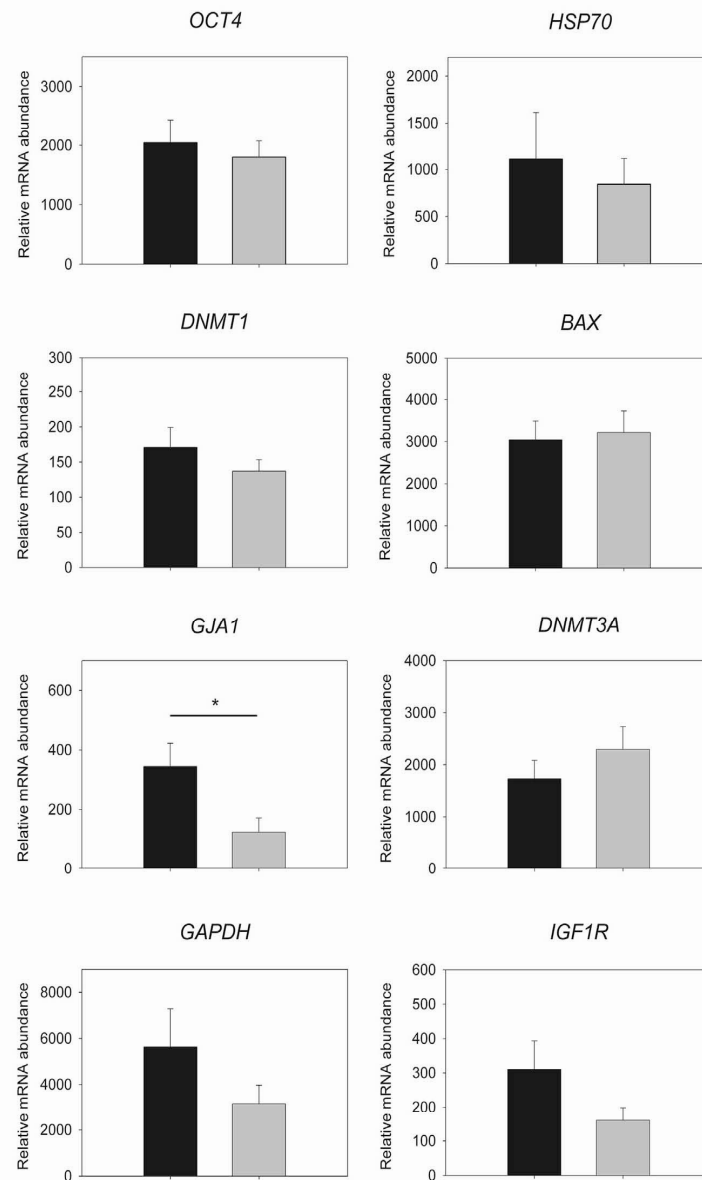


Fig. 3. Relative mRNA abundances in single blastocysts relative mRNA abundances in blastocysts after IVF in presence (+Oviductin, black bars) or absence (-Oviductin, gray bars) of recombinant oviductin. Values are shown as mean \pm SEM, * $P < 0.05$.

IVF was sufficient to influence cleavage and blastocyst rates positively and change the number of blastomeres in blastocysts [32].

Gene expression analysis during preimplantation development is a powerful tool to uncover factors affecting embryo quality, including in cat embryos [42–44]. It is an even more sensible method compared with conventional criteria like embryo morphology and developmental rates [29]. Until now, it is well proven that *in vitro*-derived embryos show an altered gene expression pattern of various

developmental important genes compared with their *in vivo* counterparts [45–48]. Relative mRNA abundances were even altered when embryos were produced by *in vitro* maturation and fertilization and then transferred into the oviduct compared with complete *in vitro* production [49]. This leads to the suggestion that the oviductal fluid and oviductin have a great impact on embryo quality that is also reflected by gene expression levels. In this study, we did find a significantly increased *GJA1* expression level in embryos produced in the presence of oviductin. This is of

special importance because *GJA1* was shown to be a marker of embryo quality in several previous studies. In fact, in cows it was the first gene recognized as a marker, as it was present in *in vivo* embryos but completely absent in *in vitro* blastocysts [47]. Also in bovine embryos, Lonergan et al. [49] demonstrated a dramatic increase of *GJA1* levels during development from 8- to 16-cell embryo to blastocyst when cultured in the oviduct while levels remained low in *in vitro* embryos. Similarly, in a previous study in *in vitro* cat embryos that examined the temporal pattern of *GJA1* expression from the oocyte to the blastocyst stage, we showed that expression levels were detectable but remained low during development [22]. However, in this work only *in vitro* embryos were examined and not compared with *in vivo* embryos. Taken together, the elevated *GJA1* expression after oviductin presence indicates a positive influence of recombinant oviductin on embryo quality, although developmental capacity did not change.

4.1. Conclusion

We were able to show for the first time an influence of recombinant produced cat oviductin on sperm binding to the ZP as well as on gene expression in embryos following IVF in the presence of the protein, indicating an increased IVM/IVF embryo quality. Although cleavage and developmental rates were not changed significantly, the obtained results are promising and improve understanding the impact of the oviductal environment on fertilization and embryo development. In future studies, methodical adaptations (longer incubation time and concentration differences) need to be examined and attention needs to be drawn on the sufficient purification of eukaryotic recombinant oviductin in its posttranslational modified form.

Acknowledgments

We are very thankful to Gynemed GmbH and Co. KG for providing the laser for the oocyte dissection. For providing cat ovaries and testes we thank the veterinary clinic in the animal shelter at Berlin. We thank Stephan Karl for his technical assistance.

Funding: This work was funded by the German Research Foundation (BR 4021/1–1).

Competing interests

The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

- [1] Marnier C, Saint-Dizier M, Tahir MZ, Chastant-Maillard S, Reynaud K. Expression of oviduct-specific glycoprotein in the canine oviduct during the periovulatory period. *Reprod Fertil Dev* 2013;26:187–8.
- [2] Verhage HG, Mavrogianis PA, Boomsma RA, Schmidt A, Brenner RM, Slayden OV, et al. Immunologic and molecular characterization of an estrogen-dependent glycoprotein in the rhesus (*Macaca mulatta*) oviduct. *Biol Reprod* 1997;57:525–31.
- [3] Jaffe RC, Arias EB, ODayBowman MB, Donnelly KM, Mavrogianis PA, Verhage HG. Regional distribution and hormonal control of estrogen-dependent oviduct-specific glycoprotein messenger ribonucleic acid in the baboon (*Papio anubis*). *Biol Reprod* 1996;55:421–6.
- [4] Janjanam J, Singh S, Choudhary S, Pradeep MA, Kumar S, Kumaresan A, et al. Molecular cloning, sequence characterization and heterologous expression of buffalo (*Bubalus bubalis*) oviduct-specific glycoprotein in *E. coli*. *Mol Biol Rep* 2012;39:10031–43.
- [5] Boice ML, Geisert RD, Blair RM, Verhage HG. Identification and characterization of bovine oviductal glycoproteins synthesized at estrus. *Biol Reprod* 1990;43:457–65.
- [6] Hachen A, Jewgenow K, Braun BC. Sequence analysis of feline oviductin and its expression during the estrous cycle in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* 2012;77:539–49.
- [7] Bui WC. Characterization and biological roles of oviduct-specific, estrogen-dependent glycoprotein. *Reproduction* 2002;123:355–62.
- [8] Aviles M, Gutierrez-Adan A, Coy P. Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Mol Hum Reprod* 2010;16:896–906.
- [9] Martus NS, Verhage HG, Mavrogianis PA, Thibodeaux JK. Enhancement of bovine oocyte fertilization in vitro with a bovine oviductal specific glycoprotein. *J Reprod Fertil* 1998;113:323–9.
- [10] Pradeep MA, Jagadeesh J, De AK, Kaushik JK, Malakar D, Kumar S, et al. Purification, sequence characterization and effect of goat oviduct-specific glycoprotein on in vitro embryo development. *Theriogenology* 2011;75:1005–15.
- [11] Coy P, Canovas S, Mondejar I, Saavedra MD, Romar R, Grullon L, et al. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:15809–14.
- [12] Wegner CC, Killian GJ. In vitro and in vivo association of an oviduct estrus-associated protein with bovine zona pellucida. *Mol Reprod Dev* 1991;29:77–84.
- [13] Gandolfi F, Modina S, Brevini TAL, Galli C, Moor RM, Lauria A. Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona-pellucida, perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *Eur J Basic Appl Histochem* 1991;35:383–92.
- [14] Boice ML, McCarthy TJ, Mavrogianis PA, Fazleabas AT, Verhage HG. Localization of oviductal glycoproteins within the zona-pellucida and perivitelline space of ovulated ova and early embryos in baboons (*Papio-Anubis*). *Biol Reprod* 1990;43:340–6.
- [15] Boatman DE, Magnoni GE. Identification of a sperm penetration factor in the oviduct of the golden-hamster. *Biol Reprod* 1995;52:199–207.
- [16] King RS, Killian GJ. Purification of bovine estrus-associated protein and localization of binding on sperm. *Biol Reprod* 1994;51:34–42.
- [17] King RS, Anderson SH, Killian GJ. Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J Androl* 1994;15:468–78.
- [18] Abe H, Sendai Y, Satoh T, Hoshi H. Bovine oviduct-specific glycoprotein – a potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in-vitro. *Mol Reprod Dev* 1995;42:226–32.
- [19] Ringleb J, Rohleder M, Jewgenow K. Impact of feline zona pellucida glycoprotein B-derived synthetic peptides on in vitro fertilization of cat oocytes. *Reproduction* 2004;127:179–86.
- [20] Roth TL, Swanson WF, Wildt DE. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized in-vivo versus in-vitro. *Biol Reprod* 1994;51:441–51.
- [21] Spindler RE, Wildt DE. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. *Biol Reprod* 1999;61:188–94.
- [22] Waurich R, Ringleb J, Braun BC, Jewgenow K. Embryonic gene activation in in vitro produced embryos of the domestic cat (*Felis catus*). *Reproduction* 2010;140:531–40.
- [23] Comizzoli P, Wildt DE, Pukazhenthi BS. Poor centrosomal function of cat testicular spermatozoa impairs embryo development in vitro after intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 2006;75:252–60.
- [24] Ringleb J, Waurich R, Wubbelt G, Streich WJ, Jewgenow K. Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilize in vitro-matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI. *Reprod Fertil Dev* 2011;23:818–25.
- [25] Lengwinat T, Blotner S. In-vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1994;35:291–301.
- [26] Freistedt P, Stojkovic M, Wolf E. Efficient in vitro production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium: effects of season and ovarian status. *Biol Reprod* 2001;65:9–13.
- [27] Gomez MC, Pope E, Harris R, Mikota S, Dresser BL. Development of in vitro matured, in vitro fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. *Theriogenology* 2003;60:239–51.

- [28] Pope CE. Aspects of in vivo oocyte production, blastocyst development, and embryo transfer in the cat. *Theriogenology* 2014;81:126–37.
- [29] Wrenzycki C. Analyse der Genexpressionsmuster zur Beurteilung der Embryonenqualität. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2007;4: 234–9.
- [30] Hill JL, Walker SK, Brown GH, Nancarrow CD. The effects of an estrus-associated oviductal glycoprotein on the in vitro fertilization and development of ovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1996;46: 1379–88.
- [31] Kouba AJ, Abeydeera LR, Alvarez IM, Day BN, Bui WC. Effects of the porcine oviduct-specific glycoprotein on fertilization, polyspermy, and embryonic development in vitro. *Biol Reprod* 2000; 63:242–50.
- [32] Lloyd RE, Romar R, Matas C, Gutierrez-Adan A, Holt WV, Coy P. Effects of oviductal fluid on the development, quality, and gene expression of porcine blastocysts produced in vitro. *Reproduction* 2009;137:679–87.
- [33] O'DayBowman MB, Mavrogianis PA, Reuter LM, Johnson DE, Fazleabas AT, Verhage HG. Association of oviduct-specific glycoproteins with human and baboon (*Papio anubis*) ovarian oocytes and enhancement of human sperm binding to human hemizonae following in vitro incubation. *Biol Reprod* 1996;54:60–9.
- [34] Hachen A, Jewgenow K, Krause E, Braun BC. Recombinant feline oviductin: a powerful tool for functional IVF studies in the domestic cat. *Reprod Domest Anim* 2012;47:88–92.
- [35] McCauley TC, Bui WC, Wu GM, Mao J, Caamano JN, Didion BA, et al. Oviduct-specific glycoprotein modulates sperm-zona binding and improves efficiency of porcine fertilization in vitro. *Biol Reprod* 2003;69:828–34.
- [36] McBride DS, Boisvert C, Bleau G, Kan FWK. Evidence for the regulation of glycosylation of golden hamster (*Mesocricetus auratus*) oviductin during the estrous cycle. *Biol Reprod* 2004;70:198–203.
- [37] Satoh T, Abe H, Sendai Y, Iwata H, Hoshi H. Biochemical-characterization of a bovine oviduct-specific sialo-glycoprotein that sustains sperm viability in-vitro. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res* 1995;1266:117–23.
- [38] Yong P, Gu Z, Luo JP, Wang JR, Tso JK. Antibodies against the C-terminal peptide of rabbit oviductin inhibit mouse early embryo development to pass 2-cell stage. *Cell Res* 2002;12:69–78.
- [39] Lengwinat T, Pitra C, Blotner S. Developmental competence of domestic cat follicular oocytes after fertilization in-vitro with epididymal sperm and coculture of feline oviductal epithelial-cells. *Reprod Domest Anim* 1993;28:236–43.
- [40] Roth TL, Donoghue AM, Byers AP, Wildt DE, Munson L. Influence of oviductal cell monolayer coculture and the presence of corpora hemorrhagica at the time of oocyte aspiration of gamete interaction in vitro in the domestic cat. *J Assist Reprod Genet* 1993;10:523–9.
- [41] Swanson WF, Roth TL, Wildt DE. In vivo embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat. *Biol Reprod* 1994;51:452–64.
- [42] Filliers M, Goossens K, Van Soom A, Merlo B, Pope CE, de Rooster H, et al. Gene expression profiling of pluripotency and differentiation-related markers in cat oocytes and preimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev* 2012;24:691–703.
- [43] Imsoonthornruksa S, Lorthongpanich C, Sangmalee A, Srirattana K, Laowtammathron C, Tunwattana W, et al. Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22:613–24.
- [44] Sananmuang T, Phutikanit N, Nguyen C, Manee-In S, Techakumphu M, Tharasanit T. In vitro culture of feline embryos increases stress-induced heat shock protein 70 and apoptotic related genes. *J Reprod Dev* 2013;59:180–8.
- [45] Corcoran D, Fair T, Park S, Rizos D, Patel OV, Smith GW, et al. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction* 2006;131:651–60.
- [46] Magnani L, Cabot RA. In vitro and in vivo derived porcine embryos possess similar, but not identical, patterns of Oct4, Nanog, and Sox2 mRNA expression during cleavage development. *Mol Reprod Dev* 2008;75:1726–35.
- [47] Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW, Niemann H. Expression of the gap junction gene connexin43 (Cx43) in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *J Reprod Fertil* 1996; 108:17–24.
- [48] Wrenzycki C, Herrmann D, Gebert C, Carnwath JW, Niemann H. Gene expression and methylation patterns in cloned embryos. *Methods Mol Biol* 2006;348:285–304.
- [49] Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Moreira PM, Pintado B, de la Fuente J, et al. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. *Biol Reprod* 2003;69:1424–31.